

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA SILVA FORTES

INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp. EM CÃES NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS
PINHAIS E EM CAPIVARAS NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ,
BRASIL

CURITIBA

2010

FERNANDA SILVA FORTES

INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp. EM CÃES NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS
PINHAIS E EM CAPIVARAS NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ,
BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA

2010

Fortes, Fernanda Silva

Infecção por *Rickettsia* spp. em cães no município de São José dos Pinhais e em capivaras no município de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil / Fernanda Silva Fortes. – Curitiba, 2010.

103 f. : il.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2010

1. Zoonoses – Paraná. 2. *Rickettsioses*. 3. Animais como transmissores de doenças. I. Molento, Marcelo Beltrão. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título

CDU 619.6:636(816.2)



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"INFECÇÃO POR *Rickettsia spp.* EM CÃES NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS E EM CAPIVARAS NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL"** apresentada pela Fernanda Silva Fortes, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2010


Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento
Presidente/Orientador


Professor Dr. Odilon Vidotto
Membro


Professor Walfrido Kühl Svoboda
Membro

À minha querida mãe, Bernadete,
por todo o amor, apoio e incentivo;
Ao meu amado e saudoso pai, Alberi (*in memoriam*),
presença viva e exemplo eterno em minha caminhada.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter aberto todas as portas necessárias para que através delas eu passasse. Por ter acreditado no meu sonho e por tê-lo tornado realidade, que me capacitou e me deu forças para concluir mais uma etapa da minha vida.

Ao Prof^o. Dr^o. Marcelo Beltrão Molento, meu orientador, por ter me aceitado como sua orientada. Pelo tratamento de mestre e amigo que ele me destinou. Pelas orientações dadas e a suavidade com que me conduziu no resultado desse trabalho. Pela oportunidade de continuar como sua orientada, na produção futura do Doutorado. Muito obrigada!

Ao Prof^o. Dr^o. Alexander Welker Biondo, pelo carinho com que me dirigiu desde os trabalhos de graduação. Agradeço imensamente pelo apoio técnico, pela amizade e confiança.

Ao Prof^o. Dr^o. Ivan Roque de Barros Filho, pela amizade e pelos conselhos durante o curso.

Aos professores do Mestrado em Ciências Veterinárias, pelos conhecimentos repassados ao longo do curso e pelo zelo destinado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal do Paraná.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, Dorly e Benedito, e da Pós-Graduação, Maria José Botelho Maeda, pela dedicação e bom tratamento dado aos mestrandos quando a eles nos dirigíamos.

Aos mestrandos, meus amigos, Rafael Felipe da Costa Vieira e Leonardo Hermes Dutra, pela forma carinhosa e solidária com que me trataram desde que nos conhecemos. Vocês foram e serão presença marcante em minha vida. Agradeço ao Leonardo, em especial, pelo imenso apoio e auxílio técnico durante todo o curso.

Aos queridos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, Fernando Staude Kloster, Andressa Schäfer e Déborah Pondelek, pela convivência agradável e amizade.

À Técnica do Laboratório de Doenças Parasitárias, Sra. Maria Rosa Câmara, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

Às amigas Fernanda Monego e Sandra Curotto, amigas fiéis, com quem sempre pude contar.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade de São Paulo e ao Prof^o. Dr^o. Marcelo Bahia Labruna, pela recepção a mim dada e pela confiança em permitir que eu realizasse os exames necessários para a minha pesquisa.

À doutoranda e querida amiga, Iara Silveira, e ao mestrando Jonas Moraes-Filho, da Universidade do Estado de São Paulo, por terem cedido parte do seu tempo para me proporcionar orientações e auxílio na realização dos testes sorológicos.

Ao amigo Ronaldo Vianna Leite Filho, pela disponibilidade e colaboração na realização desse trabalho.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de São José dos Pinhais, pela parceria nesse projeto.

À Bioquímica, Leonilda C. dos Santos, e aos Médicos Veterinários, Zalmir S. Cubas e Wanderlei de Moraes, da Itaipu Binacional, pela oportunidade que me foi ofertada no trabalho conjunto.

À minha mãe, Bernadete Silva Fortes, pelas orações constantes em prol da minha vida e dos meus estudos. Pelo amor, esforço e apoio dedicados.

À minha irmã, Patrícia Silva Fortes Guedes, e ao meu cunhado Alberto Augusto Guedes Junior, pela amizade e pelo apoio, em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados sobrinhos, Fernando e Luiza, pela alegria da infância com que invadem meu coração, solicitando minha atenção e oxigenando, assim, minha alma, dando-me mais força para prosseguir.

Ao meu namorado, Fabiano Suchodolak Braz, pelo amor, apoio e companheirismo. Por ter ficado ao meu lado em todos os momentos de dificuldade, sendo minha âncora, meu incentivador primeiro. Agradeço pela revisão do meu texto final. A você, dedico todo o meu amor (infinito!), carinho e respeito.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida para a realização do trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha Dissertação, o meu muitíssimo obrigada.

*Olhe no fundo dos olhos de um animal e, por um momento, troque de lugar com ele.
A vida dele se tornará tão preciosa quanto a sua e você se tornará tão vulnerável quanto
ele. Agora sorria, se você acredita que todos os animais merecem nosso respeito e nossa
proteção, pois em determinado ponto eles são nós e nós somos eles.*

(Philip Ochoa)

*Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais,
é só a fazer outras maiores perguntas.*

(Grande Sertão Veredas – João Guimarães Rosa)

RESUMO

A febre maculosa brasileira (FMB) é causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, e o carrapato *Amblyomma cajennense* é considerado seu principal vetor. Essa zoonose é responsável por altas taxas de letalidade em seres humanos e uma doença menos grave em cães. Além da *R. rickettsii*, outras espécies já foram relatadas em diferentes regiões do Brasil, mas a patogenicidade de algumas ainda permanece desconhecida. Alguns animais, incluindo cães e capivaras, são frequentemente utilizados como hospedeiros sentinelas para a distribuição da bactéria, como um indicador primário da circulação do agente em algumas regiões. Na presente dissertação, inclui-se um capítulo de revisão sobre a FMB em cães, abordando os principais aspectos epidemiológicos, clínicos e diagnósticos, bem como medidas usuais para seu tratamento e controle. Em seguida, relatam-se dois trabalhos de pesquisa para detecção sorológica de *Rickettsia* spp. em animais sentinelas, em dois municípios do estado do Paraná, pela técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando como antígenos as principais espécies de *Rickettsia* identificadas no Brasil: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. felis*. No primeiro estudo, foram testados 364 soros de cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses no município de São José dos Pinhais, Região Metropolitana de Curitiba. Esse local foi escolhido devido ao relato recente de FMB em ser humano. Inicialmente, cada soro foi testado na diluição de 1:64 contra *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Os soros positivos para pelo menos um dos antígenos foram, posteriormente, testados a partir de diluições seriadas até 1:1024 contra as seis espécies de *Rickettsia* supracitadas. Dos animais analisados, 16 (4,4%) reagiram positivamente para pelo menos uma espécie de *Rickettsia*. Dentre os positivos, dois cães apresentaram títulos sugestivos de infecção por *R. bellii* e uma amostra apresentou reação homóloga frente à *R. felis*, sendo o primeiro relato de evidência de infecção por essas espécies em cães no Sul do Brasil. Os resultados demonstram que há circulação de *Rickettsia* sp. na região. No entanto, acredita-se que o risco de infecção humana é baixo no local em estudo. No segundo trabalho, foram testados soros de 31 capivaras do Refúgio Biológico Bela Vista, da Itaipu Binacional, no município de Foz do Iguaçu, em que se buscou determinar, pela primeira vez, a soroprevalência de *Rickettsia* spp. por meio da RIFI. Um total de 19 (61,3%) amostras reagiu a pelo menos uma das espécies testadas. Houve evidência de infecção por *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii* em duas, uma e uma capivara, respectivamente. Os resultados demonstraram a circulação de riquetsias na região, sendo possível a participação da capivara no ciclo da bactéria. Ambos os estudos demonstraram a importância da vigilância ativa da prevalência da infecção por *Rickettsia* sp em inquéritos sorológicos de animais sentinelas em diferentes regiões no estado do Paraná, Sul do Brasil.

Palavras-chave: Cão. Capivara. Sentinela. *Rickettsia* spp. Febre maculosa. RIFI.

ABSTRACT

Brazilian Spotted Fever (BSF) is caused by *Rickettsia rickettsii* bacteria and *Amblyomma cajennense* tick is considered its main vector. This zoonosis is responsible for high rate lethality in human beings and a less severe disease in dogs. Besides *R. rickettsii*, other species have been reported in different regions of Brazil, however, pathogenicity of some still remain unknown. Some animals, including dogs and capybaras, are often used as sentinel hosts for the bacteria distribution, as a primary indicator of agent circulation in certain regions. In the present dissertation, a chapter has been included on the BSF review in dogs, approaching main epidemiological, clinical and diagnostic aspects, as well as usual measures for treatment and control. Following, two research studies are reported on the serologic detection of *Rickettsia* spp. in sentinel animals, in two cities of Parana state, by the indirect immunofluorescence assay (IFA), using as antigens the main species identified in Brazil: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* and *R. felis*. In the first study, 364 dog sera from the Zoonoses Control Center at the Sao Jose dos Pinhais city, Curitiba surroundings, were tested. Local was chosen due to recent report of BSF in human beings. Initially, each serum was tested at the dilution of 1:64 against *R. rickettsii* and *R. parkeri*. Positive sera for at least one of antigens were then tested in serial dilutions until 1:1024 against the six *Rickettsia* species described above. Out of tested animals, 16 (4.4%) positively reacted for at least one *Rickettsia* species. Among positives, two dogs presented suggestive titers of *R. bellii* infection and one sample presented homologous reaction of *R. felis* infection, the first report on the evidence of infection by these two species in dog of Southern Brazil. Results demonstrated that *Rickettsia* sp. is circulating in the region. However, risk of human infection may be low in the region studied. In the second study, serum from 31 capybaras of the Bela Vista Biological Sanctuary, Itaipu Binational, Foz do Iguassu, were tested, aimed to determine, for first time, seroprevalence of *Rickettsia* spp. by IFA. A total of 19 (61.3%) samples reacted to at least one of tested species. Infection by *R. rickettsii*, *R. parkeri* and *R. bellii* was evidenced in two, one and one capybara, respectively. Results demonstrated circulation of *Rickettsia* in the region, with potential role of capybaras in the bacteria life cycle. Both studies demonstrated the importance of active surveillance of prevalence of infection by *Rickettsia* sp. in serological surveys in sentinel animals from different regions of Parana state, Southern Brazil.

Key words: Dog. Capybara. Sentinel. *Rickettsia* spp. Brazilian Spotted Fever. IFA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – APRESENTAÇÃO GERAL DA TRANSMISSÃO DA BACTÉRIA <i>Rickettsia rickettsii</i> ENTRE A POPULAÇÃO DE VETORES E O CÃO DOMÉSTICO.....	28
FIGURA 2 – PARTICIPAÇÃO DE HOSPEDEIROS AMPLIFICADORES NA MANUTENÇÃO DE <i>Rickettsia rickettsii</i> NA NATUREZA.....	30
FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL.....	54
FIGURA 4 – NÚMERO DE CÃES SOROATIVOS À REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA <i>Rickettsia</i> spp., DE ACORDO COM OS BAIRROS DA ÁREA URBANA DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS – PR, NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007.....	59
FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	TÍTULOS FINAIS DE ANTICORPOS POR REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA SEIS ESPÉCIES DE <i>Rickettsia</i> EM CÃES DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL, NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007.....	58
TABELA 2 –	BAIRROS DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS - PR QUE APRESENTARAM PELO MENOS UM CÃO REATIVO A <i>Rickettsia</i> spp., COM TÍTULOS DE ANTICORPOS \geq A 64 PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI), NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007.....	58
TABELA 3 –	TÍTULOS FINAIS DE ANTICORPOS POR REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA SEIS ESPÉCIES DE <i>Rickettsia</i> EM CAPIVARAS DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A AGOSTO DE 2008.....	74
TABELA 4 –	CARRAPATOS COLETADOS EM CAPIVARAS DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A AGOSTO DE 2008.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ	- Centro de controle de zoonoses
C.R.D.	- com raça definida
DNA	- ácido desoxirribonucléico
ELISA	- ensaio imunoenzimático
et al.	- e colaboradores
EUA	- Estados Unidos da América
FMB	- febre maculosa brasileira
GA	- grupo ancestral
GFM	- grupo da febre maculosa
GT	- grupo do tifo
GTr	- grupo de transição
hab	- habitantes
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Ig	- imunoglobulina
IgG	- imunoglobulina G
IgM	- imunoglobulina M
MG	- Minas Gerais
min	- minutos
PAEI	- provável antígeno envolvido na infecção
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline solution</i> – Solução fosfato tamponada
PCR	- reação em cadeia pela polimerase
qsp	- quantidade suficiente para
RFLP	- polimorfismo do fragmento de restrição
RMSF	- <i>Rocky Mountain Spotted Fever</i> – Febre maculosa das montanhas rochosas
rpm	- rotações por minuto
PR	- Paraná
RBBV	- Refúgio Biológico Bela Vista
RIFI	- reação de imunofluorescência indireta

SP	- São Paulo
sp.	- espécie
spp.	- espécies
S.R.D.	- sem raça definida
TESP	- tifo exantemático de São Paulo
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
USP	- Universidade do Estado de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- por cento
μm	- micrometro
$^{\circ}\text{C}$	- graus Celsius
mg	- miligrama
kg	- quilograma
km^2	- quilômetro quadrado
M	- molar
pH	- potencial hidrogeniônico
μL	- microlitro
X	- vezes
\geq	- maior ou igual
®	- marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO GERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2 FEBRE MACULOSA BRASILEIRA EM CÃES: REVISÃO	20
2.1 INTRODUÇÃO	22
2.2 HISTÓRICO	23
2.3 ETIOLOGIA	24
2.4 VETORES	25
2.5 TRANSMISSÃO	27
2.6 RESERVATÓRIOS E HOSPEDEIROS AMPLIFICADORES	29
2.7 HOSPEDEIROS SENTINELAS	31
2.8 ASPECTOS CLÍNICOS	32
2.9 DIAGNÓSTICO	34
2.9.1 Diagnóstico indireto	35
2.9.2 Diagnóstico direto	36
2.9.3 Diagnóstico diferencial	37
2.10 TRATAMENTO	37
2.11 PREVENÇÃO E CONTROLE	38
2.12 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
3 SOROPREVALÊNCIA PARA <i>Rickettsia</i> spp. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ, SUL DO BRASIL	50
3.1 INTRODUÇÃO	52
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.2.1 Área de estudo	54
3.2.2 Animais experimentais	55
3.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	55
3.2.4 Análise estatística	56
3.3 RESULTADOS	57
3.4 DISCUSSÃO	60
REFERÊNCIAS	63
4 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Rickettsia</i> spp. EM CAPIVARAS (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>) DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, SUL DO BRASIL	68
4.1 INTRODUÇÃO	70
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	71
4.2.1 Área de estudo	71
4.2.2 Animais experimentais	72
4.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	73
4.3 RESULTADOS	73
4.4 DISCUSSÃO	75
REFERÊNCIAS	79
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	87
VITA	105

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* compreende diversas espécies de bactérias que são transmitidas pela picada de artrópodes, sendo algumas de patogenicidade conhecida para animais vertebrados. Entre as diferentes espécies, a *Rickettsia rickettsii* é considerada a mais patogênica (PAROLA *et al.*, 2005), e o carrapato *Amblyomma cajennense* é incriminado como o principal vetor do agente no Brasil, onde a doença é denominada febre maculosa brasileira (FMB) (GUEDES *et al.*, 2005). Existem inúmeros relatos de casos humanos desde a década de 1920 no país e, recentemente, a doença clínica foi descrita em cães (LABRUNA *et al.*, 2009).

No Brasil, a FMB foi relatada inicialmente em seres humanos no ano de 1929, com vários registros entre 1930 e 1940. Durante o período que compreende os anos de 1950 a 1980, houve um decréscimo no número de casos relatados. A partir do fim da década de 1980, até o presente momento, tem ocorrido uma clara reemergência da enfermidade no país. Esse aumento de casos pode ser parcialmente atribuído ao incremento na fiscalização da doença, cuja notificação tornou-se obrigatória no ano de 2001 (LABRUNA, 2009).

A infecção humana causada por *R. rickettsii* vem sendo relatada mais frequentemente na Região Sudeste, onde é endêmica em algumas áreas. No Estado de São Paulo, foram confirmados 128 novos casos entre o período de 2005 a 2007, com uma taxa de letalidade de 29% (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2008). Além dessa Região, a doença já foi notificada em outras partes do país. No entanto, o conhecimento epidemiológico nesses locais é bastante escasso, sendo considerada não endêmica ou desconhecida em grande parte dos estados brasileiros. Na Região Sul, em particular, a FMB em seres humanos já foi registrada nos três Estados (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (MADEIRA, 2004). No entanto, devido a diferenças clínicas e epidemiológicas, suspeita-se que o agente causador da infecção nesses locais seja de outra espécie, diferente de *R. rickettsii*.

Alguns animais, incluindo cães, cavalos e capivaras, exercem o papel de hospedeiros sentinelas para a FMB e outras riquetsioses. Assim, a sorologia nesses animais tem sido um meio diagnóstico eficiente frequentemente utilizado para determinar a exposição de seres humanos a *Rickettsia* spp. e prever alterações na

incidência de infecções em pessoas (RAOULT e PAROLA, 2007). A partir de inquéritos sorológicos para *R. rickettsii* em sentinelas, pode-se determinar novas áreas para FMB (PADDOCK *et al.*, 2002), além de serem instrumentos valiosos para a vigilância da doença.

No Estado do Paraná, a notificação do primeiro caso humano ocorreu no ano de 2005 no Município de São José dos Pinhais, localizado na região metropolitana de Curitiba. Devido à ausência de informações sobre a doença no local e, buscando iniciar estudos a fim de elucidar o perfil epidemiológico da FMB na região, realizou-se, inicialmente, um estudo com 75 cavalos de carroceiros do município e com 8 cavalos e 16 cães provenientes de quatro áreas caracterizadas como focos (um foco humano e três focos animais). Foi encontrada soropositividade contra *R. rickettsii* em 9,33% dos cavalos de carroceiros. Dos animais amostrados oriundos dos focos, a soropositividade contra *R. rickettsii* e *R. parkeri* foi de 25% e 12,5% em equinos e cães, respectivamente (FREITAS, 2007). Embora em número não representativo de animais, os resultados encontrados comprovaram a presença de atividade riquetsial no município, indicando a necessidade de continuidade dos estudos para determinar a prevalência sorológica de *Rickettsia* sp. em animais sentinelas e, assim, estimar o risco de infecção humana no local.

Nessa dissertação, relata-se um trabalho de vigilância ativa com a determinação de *Rickettsia* sp., por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em cães do Município de São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. Como embasamento teórico, foi realizada uma revisão bibliográfica abordando aspectos clínicos e epidemiológicos, entre outros, da FMB em cães.

Relata-se também, pela primeira vez, a pesquisa sorológica de *Rickettsia* spp., utilizando a RIFI, em capivaras do Município de Foz do Iguaçu, Paraná, com ausência de registro de casos de FMB até o presente momento. Dado o papel de sentinela da capivara, aliado ao crescente aumento populacional dessa espécie animal e à falta de informações sobre a doença na região, buscou-se investigar a soroprevalência para a bactéria nas capivaras amostradas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a infecção por *Rickettsia* spp. em cães no município de São José dos Pinhais, Paraná, e em capivaras no município de Foz do Iguaçu, Paraná, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar uma triagem por meio da RIFI nos cães amostrados, utilizando como antígenos *R. rickettsii* e *R. parkeri*.

Determinar a frequência de cães sororeativos para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. felis*.

Determinar a frequência de capivaras sororeativas para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. felis*.

Identificar o provável agente causador da infecção nos animais sororeativos, pela determinação de soros com título de anticorpos pelo menos quatro vezes superior para determinada espécie de *Rickettsia* em relação às outras espécies.

2 FEBRE MACULOSA BRASILEIRA EM CÃES: REVISÃO

RESUMO

A febre maculosa brasileira (FMB) é causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, de patogenicidade reconhecida para seres humanos e cães, e possui o carrapato *Amblyomma cajennense* como seu principal vetor. O cão pode ter um papel significativo na epidemiologia da FMB, particularmente em áreas urbanas, devido ao próximo contato com seres humanos. Vários estudos sorológicos em cães de diferentes estados brasileiros indicaram um contato prévio dos animais com a *R. rickettsii*, sendo inclusive considerado animal sentinela para a distribuição da bactéria. Apesar de ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*, a doença clínica no cão foi relatada apenas recentemente no Brasil. Sinais comuns da infecção podem incluir febre, depressão, anorexia, lesões oculares, hemorragias petequiais, anemia e trombocitopenia, os quais também podem ser encontrados em outras enfermidades, como a erliquiose monocítica canina, considerada a mais comum das doenças em cães transmitidas por carrapatos no país. Deste modo, o diagnóstico clínico de FMB em cães pode ser confundido com o de outras enfermidades, causando sua subnotificação. O objetivo do presente artigo de revisão sobre FMB em cães foi descrever aspectos epidemiológicos, clínicos e diagnósticos, incluindo ainda as principais medidas para seu tratamento e controle.

Palavras-chave: Febre maculosa brasileira. Cães. Carrapatos. *Rickettsia rickettsii*. *Amblyomma sp.*

BRAZILIAN SPOTTED FEVER IN DOGS: REVIEW

ABSTRACT

Brazilian spotted fever (BSF) is caused by bacteria *Rickettsia rickettsii*, highly pathogenic for human beings and dogs, and has the *Amblyomma cajennense* tick as its main vector. Dogs may play a significant role on the BSF epidemiology, particularly in urban areas, due to the close contact with human beings. Several serologic studies in dogs from different Brazilian states have indicated a previous contact of animals with the *R. rickettsii*, and they are even considered as sentinels for the bacteria distribution. Although dogs are susceptible to *R. rickettsii* infection, the clinical disease in dogs has been only recently described in Brazil. Common signs of infection may include fever, depression, anorexia, ocular lesions, hemorrhagic petechiae, anemia and thrombocytopenia, which also may be found in other diseases, such as the canine monocytic ehrlichiosis, considered the most common disease in dogs transmitted by ticks in Brazil. Thus, BSF clinical diagnosis in dogs may be confused by other diseases, causing its sub-notification. The aim of the present review article on BSF in dogs was to describe epidemiologic, clinical and diagnosis aspects, including alternatives for treatment and control.

Key words: Brazilian spotted fever. Dogs. Ticks. *Rickettsia rickettsii*. *Amblyomma* sp.

2.1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB), pode causar uma doença potencialmente fatal em seres humanos e cães. Atualmente, é considerada uma zoonose reemergente no Brasil e de grande impacto para a saúde pública, devido à dificuldade de diagnóstico e à alta mortalidade em casos humanos não tratados precocemente (GRECA *et al.*, 2008). A ocorrência da enfermidade em seres humanos já foi relatada desde a década de 20 em diferentes estados brasileiros, com maior prevalência encontrada em Minas Gerais e São Paulo (PINTER *et al.*, 2008). Em contrapartida, a doença clínica em cães foi descrita apenas recentemente no país, a partir da confirmação de FMB em dois animais procedentes do município de Itu, no estado de São Paulo, destacando a gravidade da infecção e a dificuldade de diagnóstico na população canina. É importante citar que, no referido município, a enfermidade já fora relatada anteriormente em seres humanos, evidenciando a circulação do patógeno no local (LABRUNA *et al.*, 2009).

A transmissão da FMB ocorre, principalmente, pela picada de carrapatos, sendo o *Amblyomma cajennense* considerado seu principal vetor. Em ambientes urbanos, os cães domésticos desempenham um papel epidemiológico particularmente importante, devido à aproximação de carrapatos infectados ao ambiente doméstico e no contato com o homem. É provável que o convívio entre cães e seres humanos represente um risco para a infecção humana, devido ao estreito contato com os carrapatos (PIRANDA *et al.*, 2008). Além disso, os cães são hospedeiros amplificadores desses artrópodes, aumentando o número de vetores infectados no ambiente (RAOULT e PAROLA, 2007).

Embora as informações sobre casos clínicos de FMB em cães ainda sejam escassas no Brasil, inquéritos sorológicos indicam que cães de regiões endêmicas, como São Paulo e Minas Gerais, estão expostos à infecção pela bactéria (SEXTON *et al.*, 1993; LEMOS *et al.*, 1994; LEMOS *et al.*, 1996; HORTA *et al.*, 2004; SANGIONI *et al.*, 2005; LABRUNA *et al.*, 2007a). Sabe-se, ainda, que o risco de contato com o patógeno é mais elevado em cães do que em seres humanos, tendo em vista a maior exposição dos animais a carrapatos vetores competentes (SCORPIO *et al.*, 2008). Assim sendo, veterinários que atuam em áreas com notificação de FMB em seres humanos devem considerar a possibilidade de

infecção canina e a solicitação de confirmação laboratorial para a obtenção de um diagnóstico preciso, além de auxiliar, dessa forma, a vigilância local da doença.

2.2 HISTÓRICO

A febre maculosa causada pela espécie *R. rickettsii* foi relatada pela primeira vez em seres humanos no ano de 1899, por Edward E. Maxey, na região montanhosa do noroeste dos Estados Unidos (EUA), onde a doença foi denominada febre maculosa das montanhas rochosas (RMSF - *Rocky Mountain Spotted Fever*) (HARDEN, 1990). No início do século XX, neste país, Howard T. Ricketts estabeleceu o papel do carrapato *Dermacentor andersoni* na transmissão da doença e realizou o primeiro isolamento da bactéria (RICKETTS, 1909), que foi nomeada *Rickettsia* em sua homenagem. No Brasil, assim como nos EUA, a febre maculosa foi descrita inicialmente em seres humanos, em 1929, conhecida então como tifo exantemático de São Paulo (TESP) (PIZA *et al.*, 1932). Estudos realizados durante a década de 30 relacionando o “TESP e RMSF”, concluíram que a doença verificada no Brasil era semelhante à norte americana. A doença passou a ser conhecida como febre maculosa brasileira (FMB) e sua transmissão associada a carrapatos *Amblyomma cajennense* (DIAS *et al.*, 1937). Desde então, inúmeros casos humanos foram diagnosticados nos estados da região Sudeste e, somente no ano de 1978, houve a confirmação de *R. rickettsii* como agente causal (PHILIP *et al.*, 1978).

A primeira inoculação de *R. rickettsii* em animais data de 1906, a partir de sangue de seres humanos infectados, cujo quadro clínico observado em cobaias de laboratório foi semelhante à RMSF humana (RICKETTS, 1906). Em 1933, foi demonstrada a susceptibilidade de cães à infecção pela bactéria (BADGER, 1933). Mais tarde, durante a década de 70, foram observados sinais clínicos em cães após inoculação experimental com *R. rickettsii*, os quais foram similares aos analisados em seres humanos com RMSF (KEENAN *et al.*, 1977a; KEENAN *et al.*, 1977b). A primeira evidência de ocorrência natural da enfermidade em cães data de 1980 (LISSMAN e BENACH, 1980) e estudos subsequentes tem ampliado o conhecimento sobre a doença clínica em cães, assim como sua respectiva epidemiologia e patogenia (GREENE e BREITSCHWERDT, 2006).

Os casos clínicos de infecção por *R. rickettsii* em cães tem sido descritos predominantemente nos Estados Unidos (LISSMAN e BENACH, 1980; GREENE *et al.*, 1985; McDADE e NEWHOUSE, 1986; GASSER *et al.*, 2001; PADDOCK *et al.*, 2002; MIKSZEWSKI e VITE, 2005). No Brasil, cães foram observados clinicamente após infecção experimental por *R. rickettsii* (PIRANDA *et al.*, 2008) e, mais recentemente, houve o relato dos primeiros casos de infecção natural em cães provenientes do estado de São Paulo (LABRUNA *et al.*, 2009).

2.3 ETIOLOGIA

A *Rickettsia* spp. é uma bactéria pertencente à ordem Rickettsiales e à família Rickettsiaceae (RAOULT e ROUX, 1997), pertencente ao grupo das bactérias Gram negativas, sendo pleomórfica e pequena (0,3 a 0,5 µm por 0,8 a 2,0 µm). É um organismo intracelular obrigatório, cujo principal alvo em animais vertebrados são as células endoteliais, nas quais o agente se multiplica, causando vasculites com a ativação de plaquetas e do sistema de coagulação (GREENE e BREITSCHWERDT, 2006). Já nos artrópodes vetores, a bactéria permanece em células intestinais, glândulas salivares e ovários (RAOULT *et al.*, 2005).

O gênero *Rickettsia* foi recentemente dividido em quatro grupos distintos: o grupo da febre maculosa (GFM), o grupo do tifo (GT), o grupo de transição (GTr) e o grupo ancestral (GA) (GILLESPIE *et al.*, 2007). O GFM contém mais de 23 espécies válidas distribuídas em todos os continentes do mundo, exceto na Antártida, cuja transmissão está associada a carrapatos, sendo algumas capazes de causar doenças em animais vertebrados. A *R. rickettsii* é o principal agente etiológico desse grupo e o de maior patogenicidade para seres humanos e cães (PAROLA *et al.*, 2009). O GT contém as espécies *R. prowazekii* (agente causal do tifo epidêmico) e *R. typhi* (agente do tifo endêmico ou murino), transmitidas por piolhos e pulgas, respectivamente (EREMEEVA *et al.*, 2000). O GTr contém *R. felis* e *R. akari*, associadas a pulgas e a pequenos ácaros dos gêneros *Ctenocephalides* e *Allodermamyssus*, respectivamente. O GA é formado pelas espécies *R. bellii* e *R. canadensis*, ambas de patogenicidade desconhecida para animais. (RAOULT e ROUX, 1997)

Em seres humanos, além da *R. rickettsii*, a patogenicidade de pelo menos 14 espécies do GFM já foi comprovada (*R. aeschlimannii*, *R. africae*, *R. akari*, *R. australis*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. helvetica*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. marmionii*, *R. mongolotimonae*, *R. parkeri*, *R. sibirica*, *R. slovaca*) (RAOULT e ROUX, 1997; RAOULT *et al.*, 2002). Em cães, a *R. rickettsii* é o agente mais importante responsável pelo desenvolvimento de quadros clínicos, observados em infecções naturais e experimentais (BADGER, 1933; KEENAN *et al.*, 1977b; GASSER *et al.*, 2001). No entanto, com relação às demais espécies do GFM, ainda há poucas informações sobre seu efeito patogênico no cão, causando comumente infecções assintomáticas.

Após inoculação experimental com *R. conorii* em cães, não houve alterações clínicas ou laboratoriais nos animais, embora detectada soroconversão e ricketsemia por até 10 dias (KELLY *et al.*, 1992). Entretanto, evidências sorológicas e moleculares associaram a manifestação de doença febril aguda em cães à infecção por *R. conorii* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2006). Cães inoculados experimentalmente com *R. montana* permaneceram saudáveis após observação clínica (BREITSCHWERDT *et al.*, 1988). De forma similar, animais infectados com *R. australis* não apresentaram sinais clínicos nem ricketsemia, mesmo ocorrendo soroconversão (SEXTON *et al.*, 1991).

2.4 VETORES

Os principais transmissores de *Rickettsia* spp. do GFM a animais vertebrados são os chamados “carrapatos duros” da família Ixodidae (RAOULT *et al.*, 2005). Nos EUA, os principais vetores de *R. rickettsii* são carrapatos do gênero *Dermacentor* e seu parasitismo é frequente em cães, os quais são responsáveis pela introdução de carrapatos ao ambiente humano (McDADE e NEWHOUSE, 1986; DUMLER e WALKER, 2005). No Brasil, os principais vetores de *R. rickettsii* pertencem ao gênero *Amblyomma*, notadamente *A. cajennense* e *A. aureolatum* (PINTER e LABRUNA, 2006). Em geral, tal gênero caracteriza-se por ter uma baixa especificidade de hospedeiro, principalmente em suas fases imaturas, sendo o cão

considerado hospedeiro primário de todos os seus estádios (LABRUNA *et al.*, 2007b).

O *A. cajennense*, conhecido popularmente como “carrapato estrela” é o principal vetor de FMB, sendo encontrado em abundância nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, com distribuição limitada nos demais locais (HORTA *et al.*, 2004; SANGIONI *et al.*, 2005). Apesar de cavalos, antas (*Tapirus terrestris*) e capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) serem os principais hospedeiros de *A. cajennense*, quando a população do ixodídeo está aumentada, ele pode se alimentar em uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados. Entre estes, o cão doméstico merece destaque, sendo muitas vezes encontrado infestado por *A. cajennense* em diferentes áreas do Brasil (LABRUNA e PEREIRA, 2001).

O *A. aureolatum*, também chamado de “carrapato-amarelo-do-cão”, é encontrado em áreas de Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste, onde as condições de alta umidade e temperaturas amenas predominam durante o ano todo (PINTER *et al.*, 2004). *A. aureolatum* foi indicado como possível vetor de FMB na porção leste do estado de São Paulo (MORAES-FILHO *et al.*, 2009), sendo considerado, em alguns locais endêmicos como o município de Mogi das Cruzes, o principal transmissor do agente a seres humanos (EVANS *et al.*, 2000). Os canídeos, inclusive os cães domésticos, são os principais hospedeiros para carrapatos adultos de *A. aureolatum* e, em ambientes rurais próximos a remanescentes de floresta tropical, carrapatos adultos de *A. aureolatum* foram identificados parasitando principalmente a população de cães (EVANS *et al.*, 2000). Nesses locais, os cães são expostos a carrapatos infectados com *R. rickettsii*, podendo adquirir a infecção e ainda representar um potencial risco para a transmissão humana ao carregarem os vetores para o ambiente domiciliar, possibilitando o contato do ixodídeo com seres humanos.

Apesar de o cão ser hospedeiro primário de carrapatos *Amblyomma* sp., o *Rhipicephalus sanguineus* (“carrapato marrom do cão”) é o principal carrapato que parasita os cães no Brasil, principalmente em áreas urbanas (LABRUNA *et al.*, 2004). O *R. sanguineus* é encontrado em todas as regiões brasileiras e é capaz de sobreviver em ambientes fechados. Apesar de serem comumente encontrados em ambientes domésticos, raramente são relatados parasitando seres humanos (MORAES-FILHO *et al.*, 2009). *R. sanguineus* é descrito no Brasil como um importante transmissor de patógenos, tais como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*,

Hepatozoon canis e *Mycoplasma haemocanis* a cães. Além disso, há suspeitas de transmissão de *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Babesia gibsoni*, *Rangelia vitalli* e *R. rickettsii* (DANTAS-TORRES, 2008). Embora ainda não haja confirmação desse carrapato como vetor de FMB para cães e seres humanos no país, seu papel na transmissão do agente já foi confirmado nos EUA (NICHOLSON *et al.*, 2006) e no México (BUSTAMANTE e VARELA, 1947), além de haver suspeitas na Colômbia (LABRUNA *et al.*, 2007a). Recentemente, a participação de *R. sanguineus* na epidemiologia de *R. rickettsii* no Brasil foi evidenciada pela primeira vez em uma área endêmica da região metropolitana de São Paulo, sugerindo seu papel como transmissor da bactéria a seres humanos (MORAES-FILHO *et al.*, 2009).

2.5 TRANSMISSÃO

A transmissão de *Rickettsia* sp. do GFM a animais vertebrados está comumente associada a carrapatos. Os cães são infectados com a *R. rickettsii* geralmente por meio da saliva de carrapatos infectados, no momento do repasto sanguíneo. Somente após a fixação do carrapato no hospedeiro por quatro a seis horas, há reativação da bactéria para o estado virulento, sendo regurgitada pelo artrópode, infectando o organismo no local de fixação (GREENE e BREITSCHWERDT, 2006). A transmissão de *R. rickettsii* entre a população de vetores e o cão doméstico está demonstrada na FIGURA 1.

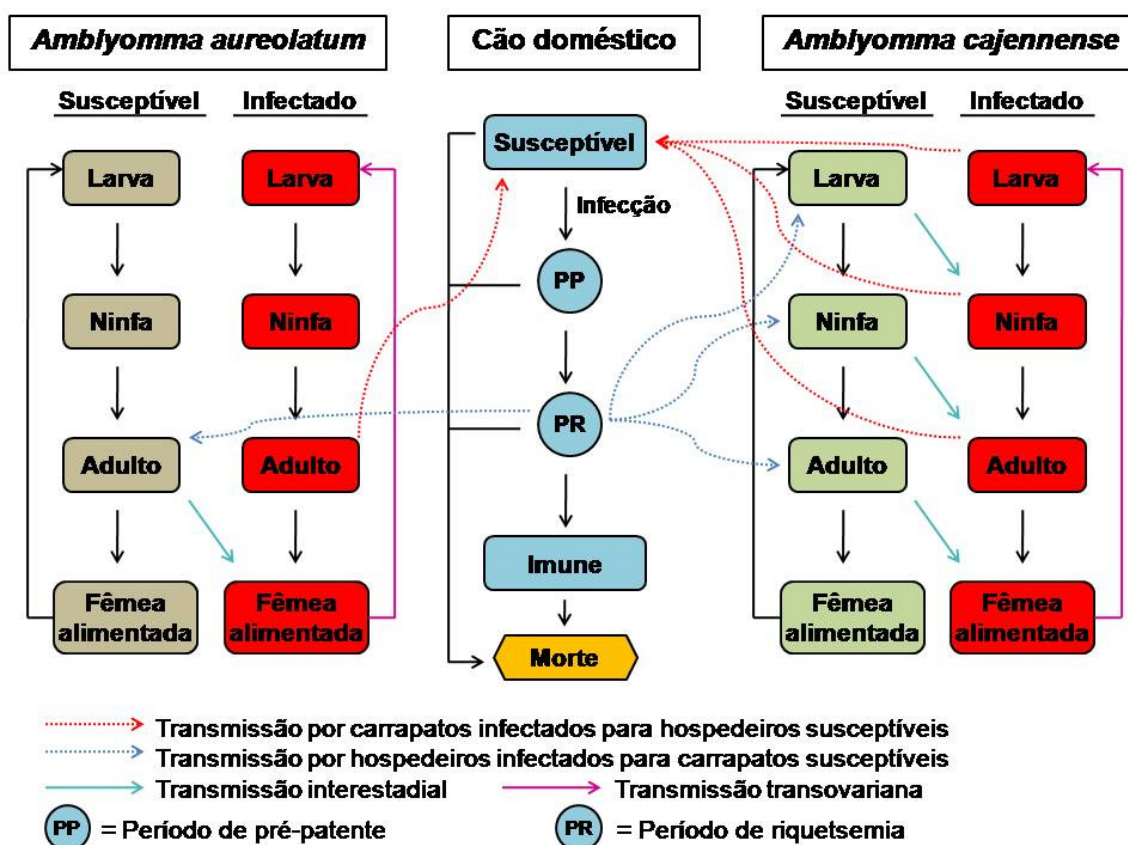


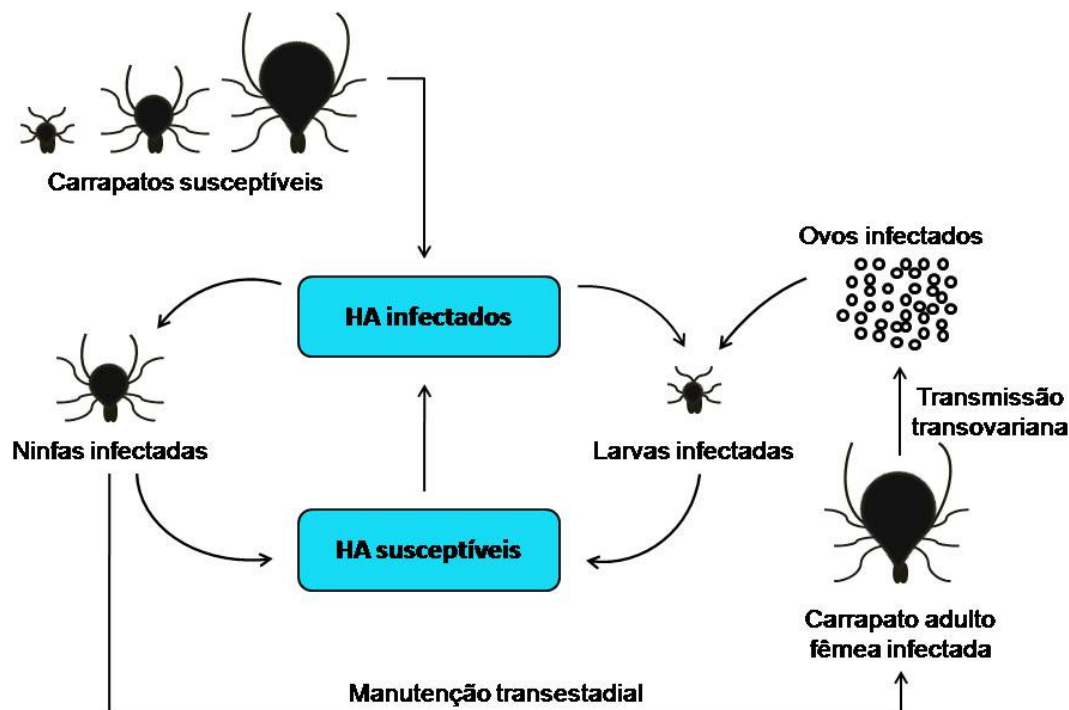
FIGURA 1 – APRESENTAÇÃO GERAL DA TRANSMISSÃO DA BACTÉRIA *Rickettsia rickettsii* ENTRE A POPULAÇÃO DE VETORES E O CÃO DOMÉSTICO
 FONTE: O autor (2010)

Carrapatos infectados contêm uma grande quantidade de riquetsias do GFM em sua hemolinfa e fezes, e a transmissão do agente também pode ocorrer pelo contato do cão com tecidos ou fluidos do vetor infectado, se retirado de seu sítio de fixação erroneamente. No momento da remoção do artrópode, a pressão excessiva sobre o carrapato pode causar sua ruptura, expondo tanto o cão quanto o homem ao risco de contaminação (RAOULT e PAROLA, 2007). Em vários relatos de infecção por *R. rickettsii* em seres humanos, a remoção manual de carrapatos em cães foi o único fator de risco conhecido associado ao desenvolvimento da doença (SHEPARD e TOPPING, 1946; SEXTON e BURGDORFER, 1975).

2.6 RESERVATÓRIOS E HOSPEDEIROS AMPLIFICADORES

Diversos gêneros de carrapatos, incluindo *Dermacentor* sp., *Rhipicephalus* sp. e *Amblyomma* sp., são importantes reservatórios de *R. rickettsii* na natureza (BURGDORFER, 1988; DUMLER e WALKER, 2005). Tais carrapatos desempenham esse papel devido à capacidade de transmitir a bactéria pelas vias transovariana (transmissão da bactéria entre sucessivas gerações) e transestadial (sobrevivência do agente em todos os estágios de vida). Assim, o carrapato permanece infectado durante toda a vida e é capaz de disseminar o organismo para os novos estádios e as novas gerações. Entretanto, apenas esse mecanismo não é suficiente para manter a bactéria ativa ao longo do tempo, tendo em vista o efeito deletério que a mesma causa nos carrapatos (McDADE e NEWHOUSE, 1986).

Acredita-se que alguns animais vertebrados, que são hospedeiros naturais de carrapatos vetores potenciais, devam assumir um papel fundamental na manutenção do patógeno na natureza, atuando como hospedeiros amplificadores da infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (DUMLER e WALKER, 2005) (FIGURA 2). Ao manter a riquetsemia durante dias ou semanas, o hospedeiro amplificador pode possibilitar a infecção de carrapatos antes não infectados e, assim, aumenta a infecção por *R. rickettsii* na população desses ixodídeos (BURGDORFER, 1988). Cinco características básicas devem ser consideradas em um animal vertebrado para que o mesmo seja considerado um hospedeiro amplificador da bactéria: (1) ser abundante em área endêmica para febre maculosa; (2) ser um bom hospedeiro natural do carrapato vetor; (3) ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*; (4) manter níveis circulantes da bactéria na corrente sanguínea (riquetsemia) suficientes para causar infecção de carrapatos que nele se alimentem; e (5) ter elevada taxa de renovação populacional, que significa a capacidade de entrada no meio ambiente de animais susceptíveis à doença (LABRUNA, 2006a).



HA = Hospedeiros amplificadores. Exemplo: algumas espécies de pequenos roedores

FIGURA 2 – PARTICIPAÇÃO DE HOSPEDEIROS AMPLIFICADORES NA MANUTENÇÃO DE *Rickettsia rickettsii* NA NATUREZA

FONTE: O autor (2010)

Na América do Norte, o efeito amplificador de algumas espécies de pequenos roedores (*Microtus pensilvanicus*, *Pitymus pinetorum*, *Peromyscus leucopus* e *Sigmodon hispidus*) já foi determinado (McDADE e NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988). No Brasil, diferentes trabalhos realizados desde a década de 30 apontam as capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e os gambás (*Didelphis spp*) como amplificadores de *R. rickettsii* para *A. cajennense* (MOREIRA e MAGALHÃES, 1935; LABRUNA, 2006a; PIRANDA *et al.*, 2008; HORTA *et al.*, 2009). Além desses animais, também já foram indicados o cão doméstico (*Canis familiaris*); o cachorro do mato (*Dusicyon sp.*, sin. *Canis brasiliensis*); o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis*, sin. *Sylvilagus minensis*); o preá (*Cavia aperea*); e a cutia (*Dasyprocta azarae*) (MOREIRA e MAGALHÃES, 1935).

O cão parece preencher muito bem os requisitos necessários para um hospedeiro amplificador. Contudo, quando se refere a cães domiciliados, cuja reprodução, muitas vezes, é manipulada pelo homem, pode haver um decréscimo nas taxas de natalidade. Assim, devido à redução na taxa de renovação populacional, não há presença suficiente de animais riquetsêmicos para garantir a

infecção de novas linhagens de carrapatos (LABRUNA, 2006a). Casos humanos de febre maculosa em foco endêmico no Arizona (EUA), associados à transmissão de *R. rickettsii* por *Rhipicephalus sanguineus*, reergueram a hipótese de os cães atuarem como hospedeiros amplificadores, pois todos os estádios do carrapato parasitam primeiramente o cão doméstico, que pode ter sido a fonte de infecção para os artrópodes (DEMMA *et al.*, 2006). Piranda *et al.* (2006) detectaram 20% de carrapatos *R. sanguineus* infectados após alimentação em cães riquetsêmicos, sugerindo também um papel amplificador desse animal em áreas endêmicas.

2.7 HOSPEDEIROS SENTINELAS

Rickettsia rickettsii pode causar grave doença em cães. No entanto, aqueles que sobrevivem à infecção são capazes de produzir anticorpos (DEMMA *et al.*, 2006). Em todo o mundo, a sorologia em cães demonstrou ser um meio viável de determinar a exposição de seres humanos a *Rickettsia* sp. e prever alterações na incidência de infecções em pessoas (RAOULT e PAROLA, 2007). Assim, os cães são considerados importantes sentinelas para riquetsioses, inclusive a FMB, em seres humanos. Tal fato se justifica, pois a soroprevalência para *R. rickettsii* em cães de determinadas áreas geográficas se aproxima da encontrada em seres humanos (BREITSCHWERDT *et al.*, 1987). Além disso, existem relatos de casos de infecção em cães e seres humanos ocorrendo simultaneamente (PADDOCK *et al.*, 2002; ELCHOS e GODDARD, 2003; ZAVALA-CASTRO *et al.*, 2006). Devido à sua capacidade de percorrer grandes distâncias, o cão pode transportar carrapatos que, quando infectados, podem ser distribuídos para locais indenes e parasitar outros hospedeiros, como outros cães, animais silvestres e seres humanos. Deste modo, a pesquisa sorológica em cães pode refletir de maneira adequada a circulação de *Rickettsia* sp. em determinado local e indicar primariamente a presença da doença.

Nos Estados Unidos, casos graves da infecção por *R. rickettsii* em seres humanos foram precedidos pela ocorrência da doença em cães, os quais foram associados à transmissão do agente para as pessoas (PADDOCK *et al.*, 2002). No mesmo país, um caso humano fatal de RMSF ocorreu algumas semanas após a morte de dois cães deste paciente, provavelmente causado pela mesma doença

(ELCHOS e GODDARD, 2003). Ambos os relatos enfatizam o papel do cão como sentinela para essa zoonose, sendo necessário haver maior comunicação entre veterinários e médicos quando se suspeita da incidência de zoonoses. A partir de inquéritos sorológicos para *R. rickettsii* em hospedeiros sentinelas, sobretudo o cão, pode-se determinar novas áreas para FMB e alertar proprietários de cães onde a bactéria é endêmica (PADDOCK *et al.*, 2002; FREITAS, 2007).

Muitas infecções causadas por *R. rickettsii* são subclínicas, e um elevado percentual de cães aparentemente saudáveis que vivem em áreas endêmicas é soropositivo para a doença. No entanto, após o contato com o agente, a soropositividade persiste ao longo do tempo. A presença de animais sororeagentes indica a circulação de *Rickettsia* do GFM, em uma determinada área, pelo menos nos últimos 6-12 meses (PIRANDA *et al.*, 2008). Deste modo, resultados sorológicos positivos não indicam necessariamente uma infecção recente. Entretanto, destaca-se a importância do cão como sentinela para a vigilância da FMB (PADDOCK *et al.*, 2002; SANGIONI *et al.*, 2005). Inquéritos sorológicos em cães provenientes de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rondônia e Paraná revelaram uma prevalência aparente de anticorpos anti-*R. rickettsii* que variou de 2 a 64% (SEXTON *et al.*, 1993; LEMOS *et al.*, 1994; LEMOS *et al.*, 1996; GALVÃO *et al.*, 2002; HORTA *et al.*, 2004; SANGIONI *et al.*, 2005; FREITAS, 2007; LABRUNA *et al.*, 2007a; PINTER *et al.*, 2008; TAMEKUNI *et al.*, 2008; TOLEDO *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2009).

No entanto, é difícil estimar a real prevalência da infecção por *R. rickettsii* em cães por meio de provas sorológicas devido à possibilidade de reações cruzadas com outras espécies de *Rickettsia* do GFM (DANTAS-TORRES, 2008). Espécies não patogênicas, como *R. bellii* e *R. rhipicephali*, também podem estimular uma resposta imune em cães, protegendo esses animais contra infecções por *R. rickettsii* (RAOULT e PAROLA, 2007).

2.8 ASPECTOS CLÍNICOS

A infecção por *R. rickettsii* em cães vem sendo relatada principalmente nos Estados Unidos, sendo clinicamente semelhante à infecção causada em seres humanos (KEENAN *et al.*, 1977b; BREITSCHWERDT *et al.*, 1988; DAVIDSON *et al.*,

1990). Nesse país, a enfermidade está relacionada com morbidade significativa e ocasional mortalidade em cães (BREITSCHWERDT *et al.*, 1985; GASSER *et al.*, 2001). Foram relatadas taxas de letalidade em cães de 7 (GREENE *et al.*, 1985), 3 (GREENE, 1987) e, mais recentemente, 0% (GASSER *et al.*, 2001). Estudos experimentais em cães demonstraram que a gravidade da doença pode estar relacionada à dose infectante de *R. rickettsii*, levando a óbito animais inoculados com doses mais elevadas (KEENAN *et al.*, 1977b). Além disso, cães recém chegados a áreas endêmicas ou que tiveram exposição primária a carrapatos sem a proteção materna de anticorpos podem apresentar um curso mais severo da infecção (LISSMAN e BENACH, 1980).

O período de incubação em cães pode variar de 2 a 14 dias após a transmissão da bactéria pelo carrapato. Os achados iniciais podem incluir febre (39,2 a 40,5°C), que surge 4 a 5 dias após a picada do carrapato, letargia, anorexia, depressão, epistaxe, petéquias e equimoses cutâneas, injeções esclerais e conjuntivite nas mucosas ocular, oral e genital. Sinais clínicos comuns também incluem tosse, dispnéia, aumento de sons broncovesiculares, linfadenite, perda de peso e desidratação dos animais (LISSMAN e BENACH, 1980; GREENE e BREITSCHWERDT, 2006). Edema de extremidades normalmente é encontrado envolvendo orelhas, lábios, mucosa peniana e escroto. Durante o estágio final da doença ou na convalescença, pode haver necrose de extremidades. Outros sinais podem ser observados nos cães como dor abdominal, diarreia, mialgia, poliartrite, além de envolvimento do sistema nervoso central (geralmente parestesia, ataxia e síndrome vestibular).

Estudos têm demonstrado que ocorre disfunção neurológica em 43% dos cães acometidos, sendo a disfunção vestibular o sinal mais frequente (MIKSZEWSKI e VITE, 2005). Além dos danos neurológicos, as sequelas pós-riquetsemia mais comumente encontradas em cães incluem lesões visuais e amputação de extremidades (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999). Alterações hematológicas incluem anemia, trombocitopenia, leucopenia leve após o aparecimento de febre, seguido por leucocitose (KEENAN *et al.*, 1977a; GASSER *et al.*, 2001). Hipoalbuminemia, hipoproteinemia, hipocalcemia, hiponatremia e aumento de enzimas hepáticas são as alterações bioquímicas mais comumente associadas à infecção em cães (GREENE e BREITSCHWERDT, 2006).

No Brasil, a partir de infecção experimental em cães com o isolado brasileiro 'Taiaçu' de *R. rickettsii*, Piranda *et al.* (2008) verificaram a susceptibilidade dos animais à infecção pelo agente. Cães doentes apresentaram sinais clínicos semelhantes aos observados nos EUA, incluindo febre (acima de 39,5°C), letargia e anorexia. Um cão apresentou lesões oculares, com congestão conjuntival e edema. O período de incubação variou de 3 a 13 dias. Quanto às alterações hematológicas, foi observada significativa diminuição na concentração de hemoglobina, no volume globular e na contagem de plaquetas durante o período febril. As contagens de eritrócitos e leucócitos não sofreram mudanças acentuadas. Nenhum cão apresentou hemorragia (cutânea ou de mucosas) e sinais neurológicos ou motores durante o experimento (PIRANDA *et al.*, 2008). Tal estudo sugere que a gravidade da doença possa estar relacionada ao modo de aquisição da infecção, o qual consistiu na inoculação de doses elevadas de *R. rickettsii* nos animais e no parasitismo de carrapatos infectados. Mais recentemente, foram relatados os primeiros casos de FMB em dois cães naturalmente infectados provenientes do município de Itu, no estado de São Paulo, cujas manifestações clínicas foram similares às descritas por Piranda *et al.* (2008), exceto nos casos de anemia e lesões oculares (LABRUNA *et al.*, 2009). Os resultados de ambos os estudos sugerem que a doença clínica causada por *R. rickettsii* em cães tem padrões semelhantes nos Estados Unidos (RMSF) e no Brasil (FMB).

2.9 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da FMB em cães é realizado com a observação de sinais clínicos e a confirmação laboratorial por meio de métodos diretos e/ou indiretos. É fundamental associar o diagnóstico laboratorial com a situação e os antecedentes epidemiológicos da região, a procedência do caso suspeito e a época do ano, para diferenciação de outras enfermidades. O histórico da presença e a exposição a carrapatos também é muito importante, por serem os principais transmissores da bactéria (GASSER *et al.*, 2001).

2.9.1 Diagnóstico indireto

O diagnóstico indireto utiliza provas sorológicas, que são os métodos mais comuns. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é considerada a prova padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de riquetsioses em animais, incluindo seres humanos e cães (LA SCOLA e RAOULT, 1997). Outros testes incluem microimunofluorescência; Weil-Felix; Microaglutinação; Hemaglutinação Indireta; Aglutinação em Látex; Fixação do Complemento; Ensaio Imunoenzimático; testes de neutralização de toxinas riquetsiais com anti-soros preparados em cobaias; teste de proteção usando vacinas em cobaias; e Western Blotting, uma ferramenta diagnóstica importante para estudos soropidemiológicos e confirmação de resultados a partir de testes sorológicos convencionais (FREITAS, 2007).

O diagnóstico de infecção por *R. rickettsii* em cães é realizado, geralmente, mediante a detecção de anticorpos séricos pela RIFI. Em geral, só é possível detectar anticorpos anti-riquetsiais após a segunda semana do início da doença. Portanto, o diagnóstico definitivo poderá ser tardio em alguns casos (LA SCOLA e RAOULT, 1997). Para a confirmação diagnóstica, é necessária uma elevação de quatro vezes no título de anticorpos em amostras pareadas (GASSER *et al.*, 2001). Alternativamente, um título único maior que 1.024 também pode ser considerado indicativo de infecção (GASSER *et al.*, 2001). Apesar de ser um teste altamente sensível, não distingue as espécies dentre os isolados, devido à possibilidade de reações cruzadas entre riquetsias do GFM (PAROLA *et al.*, 2005). Todavia, quando as amostras são testadas contra seu antígeno específico, o título resultante é mais elevado (PHILIP *et al.*, 1978).

Quando uma amostra de soro é submetida a uma bateria de testes frente a variados antígenos de *Rickettsia* spp., as diferenças entre os títulos de anticorpos são, em alguns casos, grandes o suficiente para indicar a espécie de riquetsia que estimulou a resposta imune (PINTER *et al.*, 2008). Ao apresentar um título final de anticorpos contra determinada espécie de *Rickettsia* pelo menos quatro vezes maior que o observado para quaisquer outras espécies, considera-se o soro homólogo à primeira espécie testada ou de genótipo muito estreitamente relacionado. Esse critério vem sendo utilizado em várias pesquisas sorológicas utilizando animais sentinelas no Brasil, para determinar o provável agente causador da infecção

(HORTA *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2006; LABRUNA *et al.*, 2007a; CUROTTO *et al.*, 2008; PINTER *et al.*, 2008; TAMEKUNI *et al.*, 2008).

2.9.2 Diagnóstico direto

Alguns testes foram desenvolvidos para detectar diretamente as riquetsias a partir de materiais oriundos de pacientes em fase aguda da infecção e, assim, obter resultados positivos precocemente. Destacam-se a imunodeteção da bactéria em tecidos (imunohistoquímica) ou em células endoteliais extraídas de sangue total, o isolamento em cultura de células com o sistema “shell vial” e a amplificação de DNA riquetsial pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (LA SCOLA e RAOULT, 1997).

Muito embora o isolamento da bactéria a partir de amostras de cães suspeitos seja possível, esse procedimento pode levar algumas semanas (RAOULT e PAROLA, 2007). As amostras incluem plasma, triturado de coágulo, biópsia de pele, tecidos de necropsia e mesmo os artrópodes (LABRUNA, 2006b). O cultivo é feito principalmente de células Vero, associado ou não à técnica de “shell vial”, com a penetração do agente no interior da célula. Com o isolamento por “shell vial”, são obtidos resultados positivos durante a fase de riquetsemia, antes da soroconversão, sendo útil no diagnóstico de casos agudos (LA SCOLA e RAOULT, 1997).

As técnicas de biologia molecular usadas na detecção e identificação de riquetsias são baseadas na PCR, PCR associada à análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (PCR/RFLP) e PCR-Sequenciamento. A PCR fornece resultados rápidos e é a prova de eleição para um diagnóstico precoce, fornecendo resultado antes da soroconversão e em pacientes previamente tratados. A espécie e o gênero do agente podem ser determinados por meio de sequenciamento e análise das bases dos produtos amplificados pela PCR. A PCR/RFLP apresenta resultados reprodutíveis, entretanto, o mesmo perfil eletroforético é observado em muitos isolados, dificultando a identificação das diferentes espécies do GFM (LA SCOLA e RAOULT, 1997).

É importante citar que a detecção de *Rickettsia* spp. em sangue de animais vertebrados normalmente é rara, uma vez que o período de bacteremia dura apenas alguns dias ou semanas e, posteriormente, a bactéria não é mais encontrada no

sangue (BURGDORFER, 1988). O período de bacteremia da *R. rickettsii* já foi demonstrado em cães, com detecção do agente somente até 10 dias após infecção experimental (KIDD *et al.*, 2008). Além disso, *Rickettsia* spp. infectam as células endoteliais dos animais, apresentando assim uma concentração muito baixa no sangue, dificultando a detecção por análise molecular (LA SCOLA e RAOULT, 1997).

2.9.3 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico de FMB em cães é considerado um grande desafio, devido à inespecificidade dos sinais clínicos, além da possibilidade de ocorrer infecções subclínicas (DANTAS-TORRES, 2007; SCORPIO *et al.*, 2008). A enfermidade pode ser confundida com outras doenças, devido à semelhança clínica entre elas, sendo necessário o diagnóstico diferencial contra erliquiose monocítica canina, doença de Lyme, babesiose, leishmaniose, hepatozoonose canina, doença de chagas, anaplasnose, hemobartonelose, e qualquer outra doença febril de origem inespecífica (DANTAS-TORRES, 2008; LABRUNA *et al.*, 2009).

Além disso, a co-infecção de *R. rickettsii* com outros agentes transmitidos por carrapatos, tais como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* ou *Bartonella vinsonii*, deve ser considerada em cães com um quadro clínico grave ou atípico (KORDICK *et al.*, 1999).

2.10 TRATAMENTO

O tratamento da FMB em cães é realizado com antibioticoterapia específica e seu sucesso está diretamente ligado ao achado da infecção no seu início. Quando a terapia é iniciada tardiamente, mesmo antibióticos eficazes podem não ser capazes de prevenir alterações patológicas, como necrose tissular ou danos neurológicos (GASSER *et al.*, 2001). Assim, a terapia antimicrobiana deve ser iniciada imediatamente após a suspeita clínica/epidemiológica (RAOULT *et al.*, 2005). Nos EUA, cães com doença febril aguda oriundos de regiões endêmicas para

RMSF, são rotineiramente tratados por médicos veterinários com terapia antimicrobiana dirigida contra *R. rickettsii*, mesmo sem a confirmação sorológica da infecção (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999).

Os fármacos de eleição para o tratamento da enfermidade nos cães são as tetraciclina (25 a 30 mg/Kg), doxiciclina (10 a 20 mg/Kg) ou cloranfenicol (15 a 30 mg/Kg). A tetraciclina tem sido associada à grave nefrite em cães, além de ser contra-indicada para pacientes com azotemia grave ou progressiva. Drogas lipossolúveis, como doxiciclina, têm se mostrado mais efetivas, demonstrando ter menos reações adversas no tratamento da enfermidade e são consideradas de eleição para todos os pacientes suspeitos ou confirmados. Pesquisas a partir de cães com RMSF mostraram a eficácia dessa droga no tratamento da doença (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999). O tratamento precoce com doxiciclina (20 mg/Kg via oral ou intravenosa a cada 12 horas por uma semana) melhora o prognóstico dos cães, com uma rápida resposta em um a dois dias (RAOULT; PAROLA, 2007).

O cloranfenicol também pode ser usado nos casos de hipersensibilidade a tetraciclina; porém, seu uso é limitado devido a efeitos colaterais como a aplasia medular (RAOULT *et al.*, 2005; GREENE e BREITSCHWERDT, 2006; DANTAS-TORRES, 2007). Ainda, estudos experimentais em cães infectados indicaram que a enrofloxacin teve eficácia semelhante à tetraciclina e ao cloranfenicol para o tratamento da doença (BREITSCHWERDT *et al.*, 1991). Entretanto, devido às injúrias causadas pela enrofloxacin em cartilagens, o uso deve ser evitado em cães jovens (GREENE e BREITSCHWERDT, 2006).

Devem-se instituir tratamentos de suporte como a fluidoterapia em cães desidratados, com falhas renais, choque ou diátese hemorrágica, a fim de minimizar a ocorrência de hipoperfusão em tecidos e órgãos com consequentes lesões renais, respiratórias e neurológicas (GREENE e BREITSCHWERDT, 2006).

2.11 PREVENÇÃO E CONTROLE

Atualmente, não há produção de vacinas comerciais contra FMB, e a prevenção da doença em cães depende do controle da população de carrapatos, tendo em vista que quanto maior a população desses artrópodes, maior o risco de

infecção (RAOULT e PAROLA, 2007). O controle do vetor nos cães é realizado a partir da aplicação regular de acaricidas (DAVOUST *et al.*, 2003). Os parasitas também podem ser retirados manualmente com auxílio de pinça e mortos preferencialmente em álcool ou água sanitária, ou pela aplicação de um inseticida, lavando as mãos cuidadosamente ao fim do processo (RAOULT e PAROLA, 2007). Além de se infectarem, os cães podem atuar como transportadores de carrapatos infectados. Assim, o controle desse artrópode no cão é um fator adicional importante para evitar a circulação de *Rickettsia* spp. no ambiente domiciliar humano.

O controle de carrapatos deve ser feito simultaneamente no ambiente a fim de impedir re-infestações nos cães ou o acometimento em seres humanos, pois as formas de vida livre do parasita são capazes de sobreviver por muitos meses sem hospedeiros. Medidas preventivas incluem a aplicação de acaricidas no ambiente e a manutenção da vegetação com corte baixo. Além disso, deve-se evitar a coexistência de diferentes espécies animais, sendo que a vedação adequada das casas pode impedir a entrada de animais silvestres em jardins e áreas recreativas para as quais possam trazer carrapatos (RAOULT e PAROLA, 2007).

Vale salientar que áreas sabidamente endêmicas devem contar com a colaboração da população para a prevenção e o controle da doença. Atividades educativas devem ser realizadas a fim de se esclarecer sobre os riscos para a saúde animal quando há contato entre animais de estimação e carrapatos infectados, além do risco zoonótico, de interesse em saúde pública. Em áreas de risco, como parques públicos, onde já se evidenciou a presença do vetor e ocorrência da doença, deve ser incentivada a vistoria do corpo a cada 2 a 3 horas, a utilização de roupas claras que facilitem a visualização do vetor, o uso de botas, além do esclarecimento sobre a forma correta de remoção do carrapato. Em tais áreas, deve ser evitado o acesso de cães e disponibilizada informação necessária por meio de avisos e placas em locais estratégicos (GRECA *et al.*, 2008).

O treinamento de veterinários e médicos para o diagnóstico e tratamento precoce da FMB em cães e seres humanos, respectivamente, é um ponto relevante no controle e prevenção da doença, visando minimizar a sua ocorrência. Além disso, as pessoas que habitam locais de risco devem procurar as unidades básicas de saúde caso apresentem febre ou tenham sido picadas por carrapatos.

2.12 CONCLUSÃO

Apesar de a ocorrência de FMB já ter sido descrita em seres humanos em vários estados brasileiros, o mesmo não ocorre com a população canina. No entanto, devido à maior exposição dos cães a carrapatos vetores potenciais e à susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii*, é possível que ocorra maior incidência da doença em cães do que em seres humanos. A subnotificação da doença em cães pode ocorrer devido ao conhecimento limitado da epidemiologia da doença, aliado à ocorrência de sinais clínicos inespecíficos e à falta de inclusão no diagnóstico diferencial com outras doenças febris agudas por médicos veterinários. É necessário que os proprietários sejam informados sobre o risco de contato entre animais e vetores infectados. Assim, além de conduzir a um diagnóstico preciso da FMB em cães, os proprietários podem fornecer as informações necessárias para a vigilância da doença em cães e, conseqüentemente, em seres humanos. Em áreas onde há confirmação da FMB humana, médicos veterinários devem considerar a possibilidade de ocorrência da doença em cães e solicitar a confirmação laboratorial em casos suspeitos.

Pesquisas sorológicas em populações caninas são úteis para avaliar e monitorar a frequência da FMB nas diferentes regiões do país, estabelecendo áreas de potencial risco para a transmissão da doença a cães e seres humanos, possibilitando a implantação de medidas profiláticas adequadas. Adicionalmente, o controle do carrapato vetor nos animais e no ambiente, aliado a ações de educação em saúde, são essenciais para a prevenção e o controle da doença.

REFERÊNCIAS

BADGER, L. F. Rocky Mountain spotted fever: susceptibility of the dog and sheep to the virus. **Public Health Reports**, v. 48, n. 27, p. 791-795, 1933.

BATISTA, F. G.; SILVA, D. M.; GREEN, K. T.; TEZZA, L. B. L.; VASCONCELOS, S. P.; CARVALHO, G. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Serological survey of spotted fever group *Rickettsia* sp. in horses and dogs in Almirante Tamandaré, Paraná, Brazil. In: XXI WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 2009, Calgary, Canadá. **Anais...** Calgary: 2009. CD-ROM.

BREITSCHWERDT, E. B.; DAVIDSON, M. G.; AUCOIN, D. P.; LEVY, M. G.; SZABADOS, N. S.; HEGARTY, B. C.; KUEHNE, A. L.; JAMES, R. L. Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 11, p. 2375-2381, 1991.

BREITSCHWERDT, E. B.; MEUTEN, D. J.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; KENNEDY, K.; KING, M.; CURTIS, B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a kennel epizootic. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 10, p. 2124-2128, 1985.

BREITSCHWERDT, E. B.; MONCOL, D. J.; CORBETT, W. T.; MacCORMACK, J. N.; BURGDORFER, W.; LEVY, M. G. Antibodies to spotted fever-group rickettsiae in dogs in North Carolina. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 10, p. 1436-1440, 1987.

BREITSCHWERDT, E. B.; PAPICH, M. G.; HEGARTY, B. C.; GILBER, B.; HANCOCK, S. I.; DAVIDSON, M. G. Efficacy of doxycycline, azithromycin, or trovafloxacin for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 813-821. 1999.

BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; BURGDORFER, W.; COBERTT, W. T.; HURLBERT, S. A.; STEBBINS, M. E.; CURTIS, B. C.; ALLEN, D. A. Clinical, hematologic and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 70-76, 1988.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus. In: WALKER, D. H. (Ed.) **Biology of Rickettsial Diseases**, Boca Raton, FL: CRC Press, 1988. p. 33-50.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribución de las rickettsias en México. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 8, p. 3-14, 1947.

CUROTTO, S. M. R.; FORTES, F. S.; SANTOS, L. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; GRYCAJUK, M. C. H.; BARROS-FILHO, I. R.; PACHECO, R. C.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia* spp. serological diagnosis in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from Foz do Iguaçu, Brazil. In: XI CONGRESSO E XVII ENCONTRO ABRAVAS, 2008, Santos. **Anais...** Santos: 2008. p.76-79.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 11, p. 724-732, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.

DAVIDSON, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; CARLSON, C. S.; HARDIE, E. M.; GRINDEM, C. A.; NASISSE, M. P. Vascular permeability and coagulation during *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 165-170, 1990.

DAVOUST, B.; MARIÉ, J. L.; MERCIER, S.; BONI, M.; VANDEWEGHE, A.; PARZY, D.; BEUGNET, F. Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 1, p. 91-100, 2003.

DEMMA, L. J.; EREMEEVA, M. E.; NICHOLSON, C. D.; TRAEGER, M. S.; BLAU, D. M.; PADDOCK, C. D.; LEVIN, M. L.; DASCH, G. A.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; McQUISTON, J. H. An outbreak of Rocky Mountain Spotted Fever associated with a novel tick vector, *Rhipicephalus sanguineus*, in Arizona, 2004: preliminary report. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 342-343, 2006.

DIAS, E.; MARTINS, A.; RIBEIRO, D. J. Thypho exanthematico no Oeste de Minas Gerais. **Brasil Médico**, v. 51, n. 24, p. 651-655, 1937.

DUMLER, J. S.; WALKER, D. H. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 551-553.

ELCHOS, B. N.; GODDARD, J. Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 10, p. 1450-1452, 2003.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; SILVERMAN, D. J. Interaction of rickettsiae with eukaryotic cells: Adhesion, entry, intracellular growth, and host cell responses. **Sub-cellular biochemistry**, v. 33, p. 479-516, 2000.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution. 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

FREITAS, M. O. **Detecção de Rickettsias do Grupo Febre Maculosa em cães e eqüinos em São José dos Pinhais, PR**. 79 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FREITAS, M. O.; MOLENTO, M. B.; LABRUNA, M. B.; SILVEIRA, I.; BIONDO, A. W. Pesquisa de anticorpos específicos anti-*rickettsia rickettsii* em cavalos carroceiros em São José dos Pinhais, PR. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: 2006. p.361.

GALVÃO, M. A.; LAMOUNIER, J. A.; BONOMO, E.; TROPIA, M. S.; REZENDE, E. G.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MACHADO, M. C.; OTONI, M. E.; LEITE, R. C.; CARAM, C.; MAFRA, C. L.; WALKER, D. H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1593-1597, 2002.

GASSER, A. M.; BIRKENHEUER, A. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a retrospective study of 30 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 1, p. 41-48, 2001.

GILLESPIE, J. J.; BEIER, M. S.; RAHMAN, M. S.; AMMERMAN, N. C.; SHALLOM, J. M.; PURKAYASTHA, A.; SOBRAL, B. S.; AZAD, A. F. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. **PLoS One**, v. 2, n. 3, e266, 2007.

GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L. C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 3-18, 2008.

GREENE, C. E. Rocky Mountain spotted fever. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 6, p. 666-671, 1987.

GREENE, C. E.; BREITSCHWERDT, E. B. Rocky Mountain spotted fever, murine typhus-like disease, rickettsialpox, typhus, and Q Fever. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3rd. ed., St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 232-245.

GREENE, C. E.; BURGDORFER, W.; CAVAGNOLO, R.; PHILIP, R. N.; PEACOCK, M. G. Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 5, p. 465-472, 1985.

HARDEN, V. A. **Rocky mountain spotted fever: History of a Twentieth-Century Disease**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1990.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWALSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 109-118, 2009.

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C.; HUXSOLL, Jr D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K. Studies on the pathogenesis of *Rickettsia rickettsii* in the dog: clinical and clinicopathologic changes of experimental infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 6, p. 851-856, 1977a.

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C.; HUXSOLL, Jr D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K.; CAMPBELL, J. M.; STEPHENSON, E. H. Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 135, n. 6, p. 911-917, 1977b.

KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A.; MASON, P. R.; COURTNEY, S.; KATSANDE, C.; RUKWAVA, J. Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia*

conorii. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 322-326, 1992.

KIDD, L.; MAGGI, R.; DINIZ, P. P.; HEGARTY, B.; TUCKER, M.; BREITSCHWERDT, E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group *Rickettsia* in dog blood. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 3-4, p. 294-303, 2008.

KORDICK, S. K.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; SOUTHWICK, K. L.; COLITZ, C. M.; HANCOCK, S. I.; BRADLEY, J. M.; RUMBOUGH, R.; MCPHERSON, J. T.; MacCORMACK, J. N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2631-2638, 1999.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 2006a, Viçosa. **Anais...** Viçosa: 2006. p. 63-78.

LABRUNA, M. B. Cultivo celular de Riquetsias no Brasil. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006b, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: 2006. p.132-133.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, M. D.; CAVALCANTE, C. T.; PINTER, A.; GENNARI, M. S.; CAMARGO, L. M. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Áreas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249-256, 2007a.

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C.; SZABO, M. P. J. Human Parasitism by the Capybara Tick, *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Entomological News**, v. 118, n. 1, p. 77-80, 2007b.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species

infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-8, 2004.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R. Rocky Mountain spotted fever in an endemic área in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 4, p. 497-501, 1994.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in an endemic area in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 6, p. 427-430, 1996.

LISSMAN, B. A.; BENACH, J. L. Rocky Mountain Spotted Fever in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 176, n. 10, p. 994-995, 1980.

McDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 287-309, 1986.

MIKSZEWSKI, J. S.; VITE, C. H. Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 41, n. 4, p. 259-266, 2005.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2009.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Thypho exantematico em Minas Gerais. **Brasil Médico**, v. 19, n. 21, p. 465-470, 1935.

NICHOLSON, W. L.; GORDON, R.; DEMMA, L. J. Spotted fever group rickettsial infection in dogs from eastern Arizona: how long has it been there? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 519-522, 2006.

- NILSSON, K.; LUKINIUS, A.; PAHLSON, C.; MORON, C.; HAJEN, A. N.; OLSSON, B.; LINDIQUIST, O. Evidence of *Rickettsia* spp. infection in Sweden: a clinical, ultrastructural and serological study. **Acta Pathologica Microbiológica et Immunologica Scandinavica**, v. 113, n. 2, p. 126-134, 2005.
- PADDOCK, C. D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D. B.; BERG, J. M.; JOSEPH, R. J.; ZAKI, S. R.; CHILDS, J. E. Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 2, p. 197-199, 2002.
- PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 1, p. 40-50, 2009.
- PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.
- PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; BURGDORFER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, L. E.; BELL, E. J.; Serologic typing of *Rickettsiae* of the Spotted Fever Group by microimmunofluorescence. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 5, p. 1961-1968, 1978.
- PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 324-332, 2004.
- PINTER, A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.
- PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523-530, 2006.
- PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.7, p. 696-701, 2008.
- PIRANDA, E. M.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. Avaliação preliminar do cão doméstico como fonte de infecção por *Rickettsia*

rickettsii para carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* Laitreille, 1806 (Acari: Ixodidae). In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto.

Anais... Ribeirão Preto: 2006. p. 366-366.

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, L. S. Típho exanthemático em São Paulo. **Soc. Impress. Paulista**, São Paulo, 1932.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; ABOUD, P.; CARON, F. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, p. 748-749, 2002.

RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial Diseases**. New York London: CRC Press, 2007.

RAOULT, D.; PAROLA, P.; PADDOCK, C.D. Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases challenging Old Concepts. **American Society for Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

RICKETTS, H. T. The study of "Rocky Mountain spotted fever" (tick fever?) by means of animal inoculations. A preliminary communication. **Journal of the American Medical Association**, v. 47, n. 1, p. 33-36, 1906.

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, v. 76, p. 843-855, 1909.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SCORPIO, D. G.; WACHTMAN, L. M.; TUNIN, R. S.; BARAT, N. C.; GARYU, J. W.; DUMLER, J. S. Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. **American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 5, p. 23-28, 2008.

SEXTON, D. J.; BANKS, J.; GRAVES, S.; HUGHES, K.; DWYER, B. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs from southeastern Australia.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 45, n. 2, p. 243-248, 1991.

SEXTON, D. J.; BURGDORFER, W. Clinical and epidemiologic features of Rocky Mountain spotted fever in Mississippi, 1933-1973. **Southern Medical Journal**, v. 68, n. 12, p. 1529-1535, 1975.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARDTY, B. C.; DUMLER, S.; WALKER, D. H.; PECANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espirito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993.

SHEPARD, C. C.; TOPPING, N. H. Rocky Mountain Spotted Fever: A Study of Complement Fixation in the Serum of Certain Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 78, n. 1, p. 63-68, 1946.

SOLANO-GALLEGO, L.; KIDD, L.; TROTTA, M.; DI MARCO, M.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T.; BREITSCHWERDT, E. Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1985-1988, 2006.

TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; FILHO, M. F. S.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Soroprevalência de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa em humanos, cães e eqüinos na região rural de Londrina-PR. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: 2008. 1 CD-ROM.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; FILHO, M. F. S.; HAYDU, V. B.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Infection by *Rickettsia* of the Spotted Fever Group in human, dogs, equine and *Rickettsia* spp. in ticks in Londrina, Paraná, Southern Brazil. In: VI INTERNATIONAL CONFERENCE ON TICKS AND TICK-BORNE PATHOGENS, 2008, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: 2008. 1 CD-ROM.

ZAVALA-CASTRO, J. E.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; WALKER, D. H.; RUIZ ARCILA, E. E.; LAVIADA-MOLINA, H.; OLANO, J. P.; RUIZ-SOSA, J. A.; SMALL, M. A.; DZUL-ROSADO, K. R. Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, México. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 672-674, 2006.

3 SOROPREVALÊNCIA PARA *Rickettsia* spp. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ, SUL DO BRASIL

RESUMO

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma zoonose causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, tendo como principal vetor o carrapato *Amblyomma cajennense*. Os cães podem ter um papel importante na epidemiologia da doença, particularmente em áreas urbanas, devido ao estreito contato com seres humanos, sendo frequentemente empregados como hospedeiros sentinelas para avaliar a distribuição da bactéria. O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de anticorpos contra *Rickettsia* spp. em cães do município de São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba, Paraná, Sul do Brasil, onde a FMB foi recentemente relatada em ser humano. Amostras séricas de cães foram coletadas entre fevereiro de 2006 e julho de 2007 e testadas na diluição de 1:64 por meio da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) contra *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Todos os soros reagentes para pelo menos uma das espécies de riquetsias foram testados em seguida, a partir de diluições seriadas até 1:1024, contra as seis principais espécies de *Rickettsia* identificadas no Brasil: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. felis*. Das 364 amostras testadas, 16 (4,4%) reagiram para pelo menos uma espécie de *Rickettsia*. Dentre os animais positivos, dois cães apresentaram títulos sugestivos de infecção por *R. bellii*, agente de patogenicidade ainda desconhecida em seres humanos e cães. Uma amostra apresentou reação homóloga frente à *R. felis*, agente etiológico da febre maculosa felis em seres humanos, com ocorrência confirmada no Brasil. A evidência de infecção natural por *R. bellii* e *R. felis* em cães foi relatada pela primeira vez no Sul do Brasil. Os resultados demonstram a presença de *Rickettsia* spp. nessa região do país. No entanto, a baixa prevalência encontrada sugere um baixo risco de infecção humana no local.

Palavras-chave: Febre maculosa. *Rickettsia rickettsii*. Imunofluorescência indireta.

SEROPREVALENCE OF *Rickettsia* spp. IN DOGS FROM THE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS CITY, PARANÁ, SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

Brazilian Spotted Fever (BSF) is a zoonosis caused by the *Rickettsia rickettsii* bacteria, having the *Amblyomma cajennense* tick as its main vector. Dogs may play an important role on the disease epidemiology, particularly in urban areas, due to close contact to human beings, and often employed as host sentinels for the bacteria distribution. The aim of the present study was to investigate the presence of antibodies against *Rickettsia* sp. in dogs from São José dos Pinhais, Curitiba surroundings, Paraná, Southern Brazil, where BSF was recently reported in human beings. Serum samples from dogs were collected between February 2006 and July 2007, and tested at the 1:64 dilution by indirect immunofluorescence assay (IFA) against *R. rickettsii* and *R. parkeri*. All sera which reacted at least for one of *Rickettsia* species were then tested in serial dilutions until 1:1024 against the six main *Rickettsia* species identified in Brazil: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* and *R. felis*. Out of 364 tested samples, 16 (4.4%) reacted to at least one *Rickettsia* species. Among positive animals, two dogs presented suggestive titers of *R. bellii* infection, agent of still unknown pathogenicity in human beings and dogs. One sample presented homologous reaction to *R. felis*, etiologic agent of in human beings, with confirmed occurrence in Brazil. Evidence of natural infection by *R. bellii* and *R. felis* was reported for the first time in Southern Brazil. Results demonstrated the *Rickettsia* spp. circulation on that Brazilian region. However, low prevalence found suggests a local low infection risk to human beings.

Key words: Brazilian Spotted Fever; *Rickettsia rickettsii*; Indirect immunofluorescence.

3.1 INTRODUÇÃO

Rickettsia spp. são bactérias intracelulares obrigatórias pertencentes à ordem Rickettsiales e à família Rickettsiaceae (RAOULT e ROUX, 1997). O gênero *Rickettsia* foi recentemente dividido em quatro grupos distintos: o grupo da febre maculosa (GFM), o grupo do tifo (GT), o grupo de transição (GTr) e o grupo ancestral (GA) (GILLESPIE *et al.*, 2007). No Brasil, há relatos de pelo menos sete espécies de *Rickettsia*: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* e *R. amblyommii*, todas do GFM e associados a carrapatos; *R. felis*, do GTr e *R. typhi*, do GT, ambas associadas com pulgas; e *R. bellii*, pertencente ao GA, cuja transmissão é associada a carrapatos (LABRUNA, 2009). *R. rickettsii* é um agente de patogenicidade reconhecida para seres humanos e cães, responsável por causar uma grave doença clínica chamada febre maculosa brasileira (FMB, Brasil) e febre maculosa das montanhas rochosas (RMSF – *Rocky Mountain Spotted Fever*, Estados Unidos) (LABRUNA *et al.*, 2009), sendo que pode haver variação quanto à virulência dos genótipos circulantes da bactéria (PAROLA *et al.*, 2009). A patogenicidade de *R. parkeri* para seres humanos foi mostrada nos Estados Unidos e, provavelmente, no Uruguai (PADDOCK, 2005), além de suspeitas da ocorrência de infecção humana no Brasil (LABRUNA, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2007). *R. felis* e *R. typhi* também são patogênicas para o ser humano, causando uma doença menos grave do que a infecção por *R. rickettsii* (PAROLA *et al.*, 2005). As demais espécies no Brasil (*R. bellii*, *R. rhipicephali* e *R. amblyommii*) nunca foram associadas à doença humana, embora, recentemente, *R. amblyommii* tenha sido incriminada como agente causador da doença febril em seres humanos nos Estados Unidos (APPERSON *et al.*, 2008).

Os principais vetores da FMB são carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma*, notadamente *A. cajennense* e *A. aureolatum* (PINTER e LABRUNA, 2006). Em geral, tal gênero caracteriza-se por ter uma baixa especificidade de hospedeiro, principalmente em suas fases imaturas. Alguns animais domésticos, como equinos e cães, são importantes hospedeiros amplificadores de carrapatos vetores potenciais de *Rickettsia* spp. e podem atuar como sentinelas para riquetsioses. Em ambientes urbanos, os cães domésticos desempenham um papel epidemiológico particularmente importante, devido à aproximação de carrapatos

infectados ao ambiente doméstico e ao contato com o homem (PIRANDA *et al.*, 2008).

Vários estudos sorológicos em cães de diferentes estados brasileiros indicaram um contato prévio desses animais com a *R. rickettsii*, sendo considerados hospedeiros sentinelas para a distribuição da bactéria (LEMOS *et al.*, 1996; HORTA *et al.*, 2004; SANGIONI *et al.*, 2005; LABRUNA *et al.*, 2007). A partir de inquéritos sorológicos para *R. rickettsii* em sentinelas, podem ser determinadas novas áreas para FMB, alertando a população em locais onde a bactéria é endêmica (PADDOCK *et al.*, 2002).

No Brasil, a ocorrência de FMB causada por *R. rickettsii* foi relatada inicialmente no ano de 1929 no Estado de São Paulo (PIZA *et al.*, 1932). A doença tem sido classicamente relatada na região Sudeste, apresentando-se de forma grave e evoluindo para o óbito, em casos não tratados ou tratados tardiamente. Atualmente, é considerada uma zoonose reemergente no país, com maior prevalência em Minas Gerais e São Paulo (PINTER *et al.*, 2008), sendo considerada não endêmica ou desconhecida em grande parte dos demais estados brasileiros.

Recentemente, a FMB foi relatada em seres humanos em áreas onde nunca fora registrada, como os Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MADEIRA, 2004). No entanto, os casos humanos que ocorreram no Sul do país não tiveram registros de óbitos, apresentando-se clinicamente diferentes da forma clássica que ocorre na região Sudeste, que apresenta taxas de letalidade entre 18 e 30% (ANGERAMI *et al.*, 2006; CALIC *et al.*, 2005; MADEIRA, 2004). Assim, acredita-se que o agente etiológico que causa a febre maculosa no Sul do Brasil possa ser outra espécie, diferente de *R. rickettsii*.

No Estado do Paraná, a FMB teve seu primeiro relato humano no município de São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba, no ano de 2005. Considerando o papel de sentinela do cão para a distribuição da bactéria e o relato prévio da doença no local, o objetivo do presente estudo foi realizar a vigilância ativa da presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em amostras de soro de cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses de São José dos Pinhais (CCZ/SJP).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no município de São José dos Pinhais (FIGURA 3), localizado na região metropolitana de Curitiba, Sul do Brasil ($25^{\circ}32'05''\text{S}$, $49^{\circ}12'23''\text{W}$), com altitude de 906 metros e área total de 946 km^2 , sendo aproximadamente 40% área de preservação ambiental. A população estimada no município é de 263.622 habitantes (densidade demográfica de 276 hab/km^2), da qual aproximadamente 90% está localizada em área urbana. O clima é classificado como subtropical úmido, com temperatura média anual de 16°C (IBGE, 2007). Apesar da ocorrência humana de FMB no ano de 2005, a região é considerada não endêmica para a enfermidade, e estudos para elucidar o risco de infecção no local ainda são escassos.

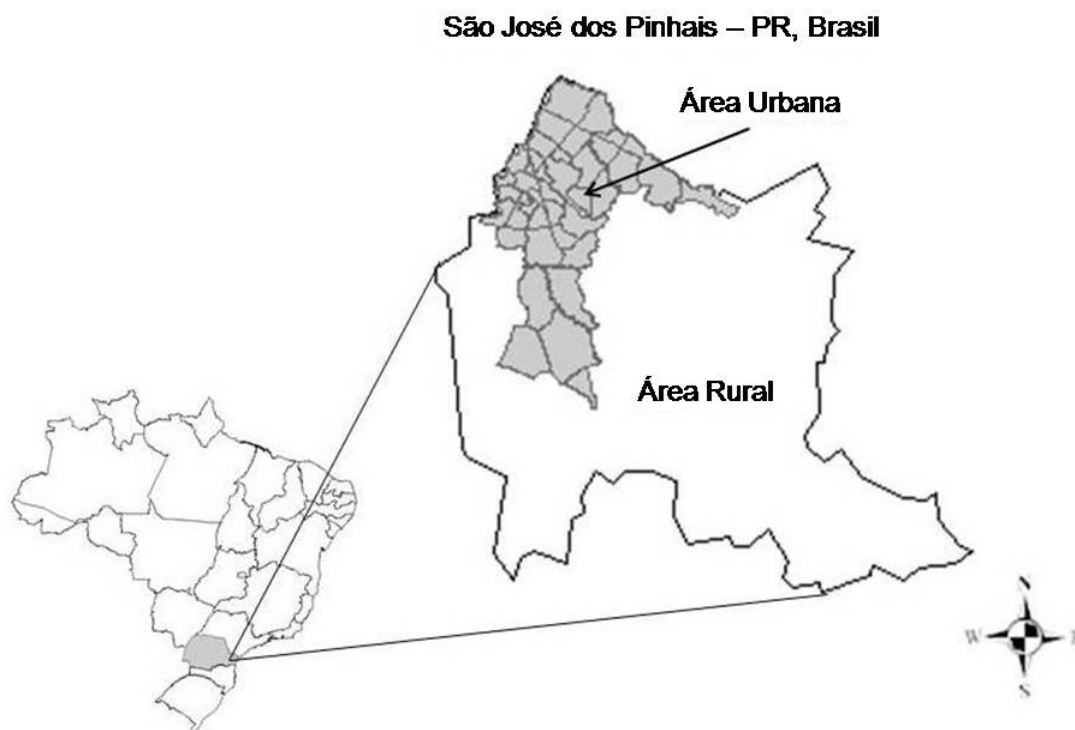


FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL
FONTE: O autor (2010)

3.2.2 Animais experimentais

Um total de 364 cães, 192 provenientes de áreas urbanas, 129 de áreas rurais e 43 de origem desconhecida, foram encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de São José dos Pinhais, Paraná, durante o período de fevereiro de 2006 a julho de 2007.

Os animais foram contidos fisicamente e anestesiados com cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg) por via intramuscular. Após a tranquilização inicial, foi administrado tiopental sódico (12,5 mg/kg) por via intravenosa para a coleta de sangue antes da eutanásia. O procedimento de eutanásia foi realizado por veterinários do CCZ, conforme o protocolo padrão e não possui relação com o presente estudo. As amostras de sangue total foram colhidas por punção intracardíaca, com auxílio de uma agulha e tubos de vidro estéreis, e encaminhadas ao laboratório, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram centrifugadas a 3.000 rpm (5 min) para a obtenção do soro, aliquotadas e armazenadas congeladas a -20°C em tubos plásticos de 1,5 mL Eppendorf® até serem testadas. Para cada cão amostrado, foi preenchida uma ficha de identificação contendo data de coleta e local de procedência, sexo, idade, raça e situação domiciliar. O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná (Protocolo 037/2008).

3.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI foi realizada segundo o protocolo descrito por Horta *et al.* (2004). O teste consistiu na reação da amostra sérica com células VERO infectadas por *Rickettsia* spp. isoladas de carrapatos do Brasil. Inicialmente, cada soro foi testado individualmente na diluição 1:64 contra os antígenos *R. rickettsii* (cepa Taiaçu) e *R. parkeri* (cepa AT24). Foi utilizado isotiocianato de fluoresceína-rotulada ovinos IgG anti-cão (produzido pelo Centro de Controle de Zoonoses, São Paulo) e, para a visualização da reação entre o antígeno fixado e o anticorpo das amostras,

microscópio ultravioleta (Olympus BX60; Olympus, Tokyo, Japan). Para cada lâmina, houve um soro positivo (controle positivo) e um soro negativo (controle negativo) para comparação.

As amostras reagentes para pelo menos uma das espécies testadas foram, posteriormente, submetidas a diluições seriadas até 1:1024 e testadas contra *R. rickettsii* (cepa Taiaçu), *R. parkeri* (cepa AT24), *R. bellii* (cepa Mogi), *R. rhipicephali* (cepa HJ5), *R. amblyommii* (cepa Ac37) e *R. felis* (cepa Pedreira), conforme o procedimento descrito anteriormente. Foi considerado sororeagente todo soro que apresentou título ≥ 64 . Este padrão vem sendo utilizado tanto em seres humanos como em animais (SANGIONI *et al.*, 2005). As amostras com título pelo menos quatro vezes superior para determinada espécie de *Rickettsia*, em relação às outras, foram consideradas homólogas à primeira espécie testada ou intimamente relacionadas (LABRUNA *et al.*, 2007; SAITO *et al.*, 2008).

3.2.4 Análise estatística

O dimensionamento das amostras utilizadas neste estudo foi calculado conforme a fórmula proposta por MARQUES e MARQUES (2005), onde:

$$n = \frac{\mathcal{Z}_c^2 \times p \times (1 - p) \times N}{e^2 \times (N - 1) + \mathcal{Z}_c^2 \times p \times (1 - p)}$$

$\mathcal{Z}_c = 1,96$ (valor fixo) tabela de distribuição normal, nível de confiança 95%

$p = 0,10$ (10%)

$N = 62.500$ (número de cães de São José dos Pinhais – PR)

$e = 0,031$ (3,1%) erro amostral

$n \approx 364$ animais

Para a análise estatística, foi utilizado o Teste do Qui-quadrado, pelo uso de programa de análises estatísticas (BioEstat 5.0®, CNPq, Brasil). As análises foram realizadas relacionando a positividade na RIFI com o sexo, a idade, a raça e a situação domiciliar dos animais. As variáveis foram analisadas considerando como significância estatística $p < 0.05$.

3.3 RESULTADOS

Dos 364 soros de cães testados contra os antígenos *R. rickettsii* e *R. parkeri* à diluição de 1:64, 16 (4,4%), reagiram a pelo menos uma das duas espécies: 12/261 (4,6%) em 2006 e 4/103 (3,9%) em 2007. Dos 16 soros reagentes, foi encontrada soropositividade para *R. parkeri* (9), *R. rickettsii* (7), *R. felis* (5), *R. amblyommii* (5), *R. bellii* (4) e *R. rhipicephali* (3) (TABELA 1). Dois cães tiveram títulos sugestivos de infecção por *R. bellii* e uma amostra apresentou reação homóloga para *R. felis*.

Em 26,5% (9/34) das áreas urbanas foi encontrado pelo menos um animal reagente pela RIFI (TABELA 2 e FIGURA 4), tendo origem desconhecida um dos animais sororeagentes. Em nenhuma área rural (0/31) foi encontrado animal reagente pela RIFI.

TABELA 1. TÍTULOS FINAIS DE ANTICORPOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA SEIS ESPÉCIES DE *Rickettsia* EM CÃES DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL, NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007

Soro	Títulos pela RIFI para seis antígenos						PAEHR
	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	
8	64	-	-	64	-	-	
27	-	-	-	64	-	-	
86	-	128	-	-	-	64	
103	-	-	128	-	-	-	<i>R. bellii</i>
107	-	64	-	-	-	-	
138	256	128	-	-	128	128	
145	-	-	1024	-	-	-	<i>R. bellii</i>
162	64	128	-	-	-	-	
163	-	64	-	-	-	-	
183	64	64	64	128	-	-	
204	64	-	-	-	64	-	
244	-	-	-	-	64	-	
295	256	128	-	-	128	128	
344	-	-	-	128	-	-	<i>R. felis</i>
346	-	128	64	64	-	-	
354	128	256	-	-	64	-	

FONTE: O autor (2010)

NOTA: PAERH: possível antígeno envolvido em reação homóloga (soro com título de anticorpos pelo menos quatro vezes superior para determinada espécie de *Rickettsia* em relação às outras espécies foi considerado homólogo para a primeira espécie de *Rickettsia* testada)

NR: não-reativo para título ≥ 64

TABELA 2 - BAIRROS DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS - PR QUE APRESENTARAM PELO MENOS UM CÃO REATIVO A *Rickettsia* spp., COM TÍTULOS DE ANTICORPOS \geq A 64 PELA REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI), NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007

Bairro	Nº de cães reativos na RIFI / Nº de cães testados		Total
	2006	2007	
Afonso Pena	1/16	0/15	1/31 (3,2%)
Borda do Campo	2/10	0/1	2/11 (18,2%)
Rio Grande	1/4	1/2	2/6 (33,3%)
Cruzeiro	2/3	0/6	2/9 (22,2%)
Independência	1/2	0/0	1/2 (50%)
Itália	2/10	0/2	2/12 (16,7%)
Centro	1/19	2/10	3/29 (10,3%)
Rio Pequeno	1/7	0/0	1/7 (14,3%)
Ipê	0/5	1/4	1/9 (11,1%)

FONTE: O autor (2010)

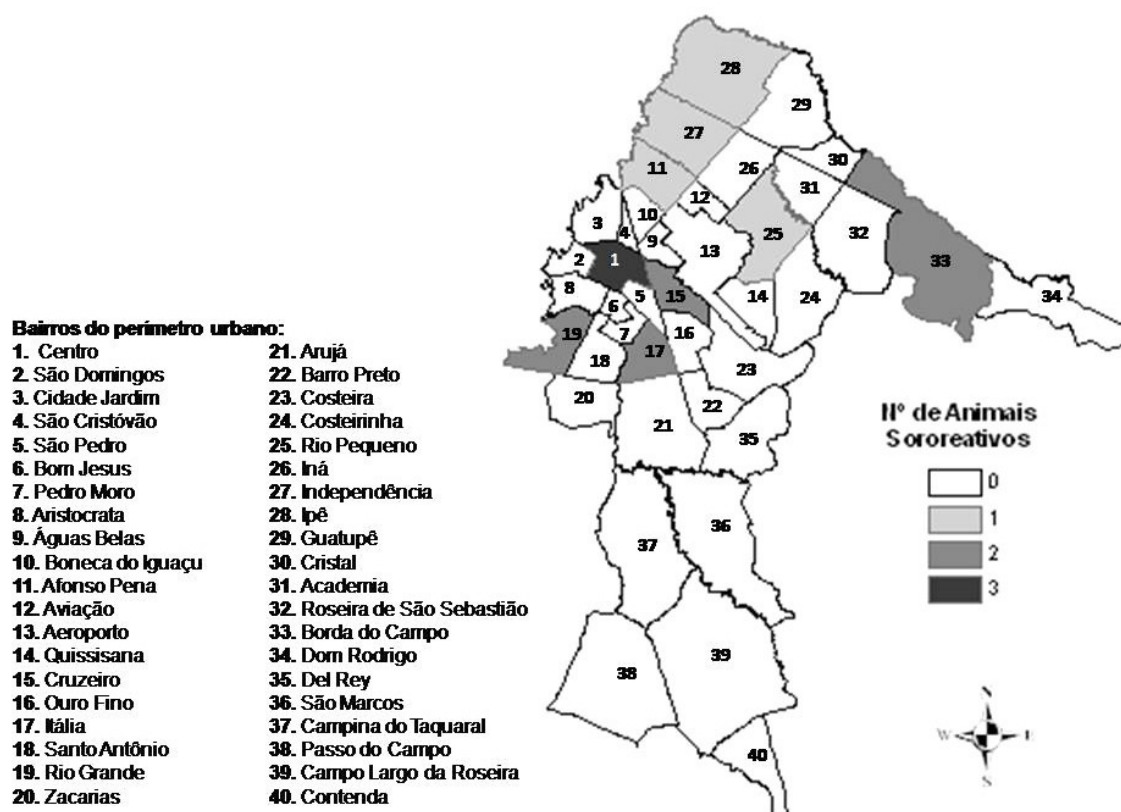


FIGURA 4 – NÚMERO DE CÃES SOROREATIVOS À REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA *Rickettsia* spp., DE ACORDO COM OS BAIRROS DA ÁREA URBANA DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS – PR, NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007

FONTE: O autor (2010)

Dentre as amostras positivas, 10/16 (62,5%) eram provenientes de cães machos e 6/16 (37,5%) de fêmeas. Com relação à idade, 15/16 (93,7%) soros pertenciam a animais adultos e 1/16 (6,2%) amostra a animal idoso. De acordo com a raça, 11/16 (68,7%) dos cães não apresentavam raça definida (S.R.D.), 2/16 (12,5%) eram da raça Rottweiler, 1/16 (6,2%) da raça Pastor Alemão, 1/16 (6,2%) da raça Cocker Spaniel Inglês e 1/16 (6,2%) da raça Pit Bull. Quanto à situação domiciliar dos cães soropositivos, 10/16 (62,5%) eram errantes e 6/16 (37,5%) eram domiciliados.

Nenhuma associação significativa foi encontrada entre os 364 cães e os parâmetros analisados, incluindo idade (filhote, adulto, idoso; $\chi^2 = 0,196$), sexo (macho, fêmea; $\chi^2 = 0,047$), raça (sem raça definida, com raça definida, $\chi^2 = 0,223$) e situação domiciliar (domiciliados e não-domiciliados, $\chi^2 = 0,016$).

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram uma porcentagem baixa (4,4%) de cães reagentes à *Rickettsia* spp. pela RIFI, quando comparados com a prevalência sorológica para *R. rickettsii* encontrada em áreas endêmicas do Estado de São Paulo (31,3%, 36,4% e 60%) e em áreas não-endêmicas (12,9%) para FMB (LEMOS *et al.*, 1996; HORTA *et al.*, 2004; HORTA *et al.*, 2007).

Nossos resultados não mostraram nenhuma evidência de infecção para *R. rickettsii* ou *R. parkeri*. Mas, uma recente pesquisa em cães de áreas endêmicas para FMB revelou a evidência de infecção para *R. rickettsii* em 4/33 (12,1%) amostras e para *R. parkeri* em 1/33 (3%) (HORTA *et al.*, 2007). Vale destacar que, nessas localidades, tem-se encontrado uma frequência maior de equinos soropositivos, quando comparados a cães, e uma baixa frequência ou ausência de seres humanos sororeagentes (LEMOS *et al.*, 1996; HORTA *et al.*, 2004).

No presente estudo, foi encontrada uma baixa soropositividade para *R. rickettsii* em cães, de 1,9% (7/364), quando comparamos a estudos anteriores realizados em áreas endêmicas para FMB na região Sudeste, que encontraram 31,3 e 81,3% de cães sororeativos contra *R. rickettsii* (HORTA *et al.*, 2004; VIANNA *et al.*, 2008) e em áreas não endêmicas na região Norte do estado do Paraná, que encontraram 11 e 23% de cães sororeativos para o antígeno (TAMEKUNI *et al.*, 2008). Tais estudos indicam a importância do cão como sentinela para a infecção humana pela bactéria e a distribuição geográfica da doença. No presente estudo, embora tenha sido encontrada uma soropositividade baixa para a bactéria nos animais amostrados, um monitoramento contínuo deve ser conduzido na região, devido às oscilações relacionadas à ocorrência da bactéria que podem ocorrer e ao desconhecimento da distribuição sazonal de carrapatos no local.

Todas as amostras positivas neste estudo foram provenientes de áreas urbanas, diferentemente de um estudo realizado no Estado de Rondônia, na região Norte do Brasil, em que foi encontrada uma prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. de 11,6 e 3,9% em cães provenientes da zona rural e urbana, respectivamente. Acredita-se que essa diferença ocorra devido à maior diversidade de carrapatos a que os cães rurais são expostos, quando comparados à zona urbana, onde apenas a presença do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* foi estabelecida (LABRUNA *et*

al., 2007). Saito *et al.* (2008) observaram que cães que tiveram contato prévio com pastagens ou áreas de floresta apresentaram duas vezes mais chances de serem sororeativos para *Rickettsia* do que sem esse contato direto. No entanto, nossos resultados não indicaram sororeatividade em animais de localidades rurais, sugerindo uma distribuição limitada da bactéria no município de São José dos Pinhais - PR.

No município de Caratinga, uma região de Minas Gerais com ausência de registro de casos de FMB nos últimos 12 anos, não houve detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii* em nenhum dos 73 cães amostrados (CARDOSO *et al.*, 2006). Em Santa Cruz do Escalvado - MG, antigo foco de FMB, foi encontrado um alto percentual de soropositividade para riquetsioses em soros de gambás e roedores (81,3%), mas uma prevalência relativamente baixa em cães (3,8%) e equinos (8,1%), sendo a área considerada de baixa endemicidade para riquetsioses (PENA *et al.*, 2009). Similarmente, a baixa porcentagem de animais reagentes à *Rickettsia* spp. encontrada no presente estudo coloca o município de São José dos Pinhais - PR em um nível de baixa transmissão para FMB.

Em pesquisa sorológica realizada com 389 cães no Rio Grande do Sul, foi encontrada uma alta porcentagem de animais (42,4%) reagentes a *Rickettsia* spp., considerando a *R. parkeri* como a provável espécie causadora da infecção em 100/389 (25,7%) cães (SAITO *et al.*, 2008). Os títulos de anticorpos encontrados para essa espécie foram muito elevados, variando de 4.096 a 65.536 em 84 cães, sendo indicativo de infecção aguda recente e do potencial patogênico de *R. parkeri* para cães. Em contraste, nesta pesquisa, os baixos títulos encontrados (64 a 1.024) para *Rickettsia* spp. sugerem uma infecção antiga nos animais, que pode ter sido causada pela *R. rickettsii* ou por uma espécie não patogênica para cães.

O presente estudo relata, pela primeira vez, a evidência de infecção natural por *R. bellii* e *R. felis* em cães no Sul do Brasil. Com frequência, *R. bellii* tem sido relatada infectando carrapatos no Estado de São Paulo (LABRUNA *et al.*, 2004; HORTA *et al.*, 2006) e a maioria das espécies de carrapatos *Amblyomma* que parasitam cães que vivem em áreas rurais do Brasil estão infectados por *R. bellii* (LABRUNA *et al.*, 2007; PINTER *et al.*, 2008). No entanto, a primeira evidência de infecção natural por *R. bellii* em hospedeiros vertebrados foi recentemente relatada, em capivaras, no Estado de São Paulo (PACHECO *et al.*, 2007). Mesmo que estritamente associada a carrapatos, *R. bellii* não pertence ao GFM e seu efeito

patogênico em seres humanos e cães nunca foi demonstrado (LABRUNA *et al.*, 2007a).

A evidência sorológica de infecção por *R. bellii* encontrada em dois cães e por *R. felis* em um cão, indica a possibilidade de circulação desses agentes no local do presente estudo. Devido aos relatos de *R. felis* como um patógeno humano no Sudeste do Brasil e em vários outros países, em diferentes continentes (PAROLA *et al.*, 2005), o presente achado é um alerta para o risco zoonótico na área estudada, indicando a possibilidade de ocorrência de casos clínicos humanos causados por *R. felis* no local.

Na literatura, a maioria dos registros de *R. felis* ocorreu em pulgas *Ctenocephalides felis felis*, coletados em cães ou gatos (LABRUNA *et al.*, 2007; NAVA *et al.*, 2008; GEHRKE *et al.*, 2009). No presente estudo, nosso objetivo não foi avaliar a presença de pulgas nos animais. Além disso, casos isolados de evidências de infecção por *Rickettsia*, como os encontrados aqui para *R. bellii* e *R. felis*, não são suficientes para indicar o estabelecimento desses agentes no local.

Nenhuma evidência sorológica para a presença de infecção por *R. rickettsii* foi encontrada nos animais testados. Esse resultado era esperado, pois as amostras são provenientes de área não endêmica para FMB. Além disso, suspeita-se que a espécie de *Rickettsia* envolvida nos casos de FMB fora da região Sudeste, ou pelo menos em parte deles, seja outra que não a *R. rickettsii* (LABRUNA, 2006). Esse fato se justifica tendo em vista que cada região apresenta particularidades como presença de hospedeiros, espécie de carrapato predominante, características ambientais e risco de contato humano com possíveis vetores, sendo a origem geográfica da infecção um fator também utilizado para identificar a espécie causadora (PACHECO *et al.*, 2007). No local do presente estudo, ainda não há informações referentes ao estabelecimento de carrapatos vetores.

Em resumo, a evidência natural de infecção por *R. bellii* e *R. felis* em cães foi relatada, pela primeira vez, no Sul do Brasil, demonstrando a circulação de *Rickettsia* spp. em cães nessa região. Além disso, a baixa prevalência encontrada sugere que os cães estão expostos a uma baixa população de vetores competentes infectados por *Rickettsia* spp. do GFM e que o risco de infecção humana é baixo no local em estudo. Contudo, a vigilância epidemiológica na região é de suma importância, pois a área é considerada vulnerável a futuros casos de febre maculosa.

REFERÊNCIAS

- ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S.; SILVA, L. J. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: epidemiological aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 170–172, 2006.
- APPERSON, C. S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W. L.; MEAD, D. G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M. J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, D. W. Tickborne diseases in North Carolina: is “*Rickettsia amblyommii*” a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 5, p. 597–606, 2008.
- CALIC, S. B.; BARCELLOS-ROCHA, C. M.; LEITE, R. C.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. Old and new human rickettsiosis in Minas Gerais state, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 356-357, 2005.
- CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. Circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.
- FREITAS, M. O. **Deteção de Rickettsias do Grupo Febre Maculosa em cães e eqüinos em São José dos Pinhais, PR**. 79 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- GEHRKE, F. S.; GAZETA, G. S.; SOUZA, E. R.; RIBEIRO, A.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro/Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 2, p. 267-268, 2009.
- GILLESPIE, J. J.; BEIER, M. S.; RAHMAN, M. S.; AMMERMAN, N. C.; SHALLOM, J. M.; PURKAYASTHA, A.; SOBRAL, B. S.; AZAD, A. F. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. **PLoS One**, v. 2, n. 3, e266, 2007.
- HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group *Rickettsiae* in

humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the State of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 93–97, 2004.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 793–801, 2007.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. Natural infection, transovarial transmission, and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the Tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 285–290, 2006.

IBGE. **São José dos Pinhais**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em 24/02/2007.

LABRUNA, M. B. 2006 Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: Simpósio Brasileiro de Acarologia – SIBA, 1., Viçosa, **Anais...** p.63-78.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*: **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156–166, 2009.

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 458–460, 2009.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MORAES-FILHO, J.; LEPE, P.; GALLEGOS, J. L.; LÓPEZ, J. *Rickettsia felis* in Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 1794–1795, 2007.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p.90–98, 2004.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, J. R.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A. M.; CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: serological

survey of dogs and horses in an endemic area in the State of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 427-30, 1996.

MADEIRA, A. Surto de febre maculosa no estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 364, 2004.

MARQUES, J. M.; MARQUES, M. A. M. **Estatística para os cursos de engenharia**. Curitiba: Domínios do Saber, 2005. p.140.

NAVA, S.; PÉREZ-MARÍNEZ, L.; VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; SANTIBÁÑEZ, S.; OTEO, J. A. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* from Argentina. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 4, p. 465-466, 2008.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, v. 27, p. 364-371, 2007.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the western hemisphere. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 315– 326, 2005.

PADDOCK, C. D.; HOLMAN, R. C.; KREBS, J. W.; CHILDS, J. E. Assessing the magnitude of fatal Rocky Mountain spotted fever in the United States: comparison of two national data sources. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 349-354, 2002.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, v. 36, p. 469–492, 2005.

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 1, p. 40-50, 2009.

PENA, D. C. H.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; LABRUNA, M. B.; MILAGRES, B. S.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, 2009 Apr 15. [Epub ahead of print]

PINTER, A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey for *Rickettsia* spp. in dogs and humans from a Brazilian spotted fever

endemic area in the state of São Paulo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.7, p. 696-701, 2008.

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, L. S. Tífo exantemático em São Paulo. **Soc. Impress. Paulista**, São Paulo, 1932.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.4, p.694-719, 1997.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A. R.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 265-270, 2005.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111-1113, 2007.

TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; FILHO, M. F. S.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Soroprevalência de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa em humanos, cães e eqüinos na região rural de Londrina-PR. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: 2008. 1 CD-ROM.

VIANNA, M. C. B.; HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Rickettsial

Spotted Fever in Capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 5, p. 297-301, 2008.

4 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Rickettsia* spp. EM CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris*) DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, SUL DO BRASIL

RESUMO

As capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) estão entre os principais hospedeiros do carrapato *Amblyomma* spp., o qual pode transmitir algumas espécies de riquetsias para seres humanos e animais. Como são frequentemente infestadas por carrapatos vetores potenciais, as capivaras podem ser usadas como sentinelas para riquetsioses, como a febre maculosa brasileira. O objetivo do presente estudo foi determinar, pela primeira vez, a soroprevalência de *Rickettsia* spp., por meio da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em 21 capivaras de vida livre e 10 capivaras de cativeiro do Zoológico do Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, Brasil. Antígenos de seis espécies de riquetsias já identificadas no Brasil (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. felis*) foram utilizadas para a RIFI. Carrapatos de cada capivara foram coletados para posterior identificação taxonômica. Um total de 19 (61,3%) amostras reagiu a pelo menos uma das espécies testadas. Foi encontrada soropositividade em 14 (45,2%), 12 (38,7%), 5 (16,1%), 4 (12,9%), 3 (9,7%) e 3 (9,7%) animais para *R. rickettsii*, *R. bellii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. felis* e *R. rhipicephali*, respectivamente. Duas capivaras de cativeiro apresentaram títulos sugestivos de infecção por *R. rickettsii* e uma amostra apresentou reação homóloga frente à *R. parkeri*. Apenas uma capivara de vida livre apresentou evidência de infecção por *R. bellii*. Os carrapatos coletados sobre as capivaras foram identificados como *Amblyomma dubitatum* e *Amblyomma* sp. Os resultados evidenciam a circulação de riquetsias na região, sugerindo uma potencial participação da capivara no ciclo de vida desta bactéria.

Palavras-chave: *Rickettsia*. Febre maculosa. Sorologia. Roedores. Zoonoses. Brasil.

FREQUENCY OF ANTIBODIES AGAINST *Rickettsia* spp. IN FREE RANGING AND CAPTIVE CAPYBARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris*) FROM THE FOZ DO IGUAÇU CITY, PARANÁ, SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

Capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) are among the main hosts of *Amblyomma* spp. ticks, which is able to transmit some *Rickettsia* species to human beings and animals. Since they are often infested by potential vector ticks, capybaras may be used as sentinels for rickettsiosis, such as Brazilian Spotted Fever. The aim of the present study was to determine, for the first time, the prevalence of *Rickettsia* spp., by indirect immunofluorescence assay (IFA) in 21 free ranging and 10 captive capybaras from the Zoo of the Bela Vista Biological Sanctuary (BVBS), Itaipu Binational, Foz do Iguassu, Southern Brazil. Antigens of six rickettsial species already identified in Brazil (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. felis*) were used for IFA. Ticks from each capybara were collected for posterior taxonomic identification. A total of 19 (61,3%) samples reacted to at least one of tested species. Seropositivity was found in 14 (45.2%), 12 (38.7%), 5 (16.1%), 4 (12.9%), 3 (9.7%) and 3 (9.7%) animals for *R. rickettsii*, *R. bellii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. felis* and *R. rhipicephali*, respectively. Two captive capybaras presented suggestive titers of *R. rickettsii* infection and one sample showed homologous reaction to *R. parkeri*. Only one free range capybara presented evidence *R. bellii* infection. Ticks collected on capybaras were identified as *Amblyomma dubitatum* e *Amblyomma* sp. Results evidenced the rickettsial circulation in the area, suggesting a potential role of capybaras on this bacterial life cycle.

Key words: *Rickettsia*. Spotted fever. Serology. Rodents. Zoonoses. Brazil.

4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* é constituído por diferentes espécies de bactérias intracelulares obrigatórias, muitas das quais causam doenças zoonóticas em diferentes partes do mundo, enquanto outras são consideradas não patogênicas ou de patogenicidade ainda desconhecida para seres humanos (LABRUNA, 2009). No Brasil, há relatos de pelo menos sete espécies de riquetsias: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. bellii*, todas associadas a carrapatos; e *R. felis* e *R. typhi*, associadas a pulgas. A febre maculosa causada por *R. rickettsii* é responsável por altas taxas de letalidade em seres humanos e, no Brasil, é chamada febre maculosa brasileira (FMB) (LABRUNA, 2009).

R. parkeri, reconhecido recentemente como agente patogênico de uma febre maculosa mais branda nos Estados Unidos e, possivelmente, no Uruguai (PADDOCK, 2005), também está ocorrendo no Brasil. Ainda não há relatos de casos humanos devido à *R. parkeri* no país, mas o agente já foi detectado em carrapatos *Amblyomma triste* e *A. dubitatum*, no Estado de São Paulo (LABRUNA *et al.*, 2004b; SILVEIRA *et al.*, 2007). Além disso, evidências sorológicas de infecção por *R. parkeri* têm sido relatadas em cães, cavalos, gambás (HORTA *et al.*, 2007) e em capivaras (PACHECO *et al.*, 2007), no mesmo Estado.

R. felis e *R. typhi* ocasionam uma doença menos grave em seres humanos do que a causada por *R. rickettsii* (PAROLA *et al.*, 2005) e ambas já foram relatadas no Brasil (LABRUNA, 2009). Outros agentes, como *R. bellii*, permanecem de patogenicidade desconhecida para seres humanos, embora essa espécie tenha sido relatada infectando inúmeras espécies de carrapatos no país (ESTRADA *et al.*, 2006; HORTA *et al.*, 2007; LABRUNA *et al.*, 2004a; LABRUNA *et al.*, 2004b; PINTER e LABRUNA, 2006; LABRUNA *et al.*, 2007; PACHECO *et al.*, 2009).

O carrapato *A. cajennense* é considerado o principal vetor da FMB (GUEDES *et al.*, 2005), estando os equinos, capivaras e antas entre seus principais hospedeiros. A capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), em particular, é também hospedeiro primário para o *A. dubitatum* que, embora ainda não tenha confirmada sua competência vetorial para *R. rickettsii*, é suspeito de participar na transmissão de riquetsias para seres humanos (PACHECO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2009). Como são frequentemente infestadas por carrapatos vetores potenciais, as capivaras

podem vir a indicar primariamente a presença de *Rickettsia* spp. em determinado local, atuando como hospedeiros sentinelas para FMB e outras riquetsioses.

As maiores prevalências de FMB em seres humanos foram encontradas em determinadas áreas dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (PINTER *et al.*, 2008) onde, geralmente, a presença abundante de capivaras tem sido relatada. No entanto, há pouca informação sobre a epidemiologia da doença na maior parte dos demais estados brasileiros, sendo considerada não endêmica ou desconhecida nesses locais. Considerando o papel de sentinela da capivara para FMB e a crescente população dessa espécie animal no local em estudo, a presente pesquisa avaliou a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em amostras de soro de capivaras de cativeiro do Zoológico Roberto Ribas Lange e de capivaras de vida livre, no Refúgio Biológico Bela Vista, localizado dentro da área da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional, no município de Foz do Iguaçu, Paraná, Sul do Brasil, onde a FMB não foi relatada previamente.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local de estudo

O Refúgio Biológico Bela Vista (RBBV), situado dentro da área da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional, está localizado no município de Foz do Iguaçu (25°32'45"S, 54°35'07"W), Paraná, na fronteira do Brasil com o Paraguai e a Argentina (FIGURA 5). O Zoológico Roberto Ribas Lange, que pertence ao RBBV, possui uma população de dez capivaras mantidas em cativeiro, as quais mantêm contato próximo com capivaras de vida livre e outros animais, além da população humana exposta, como funcionários da Usina Hidrelétrica de Itaipu e turistas de Foz do Iguaçu.

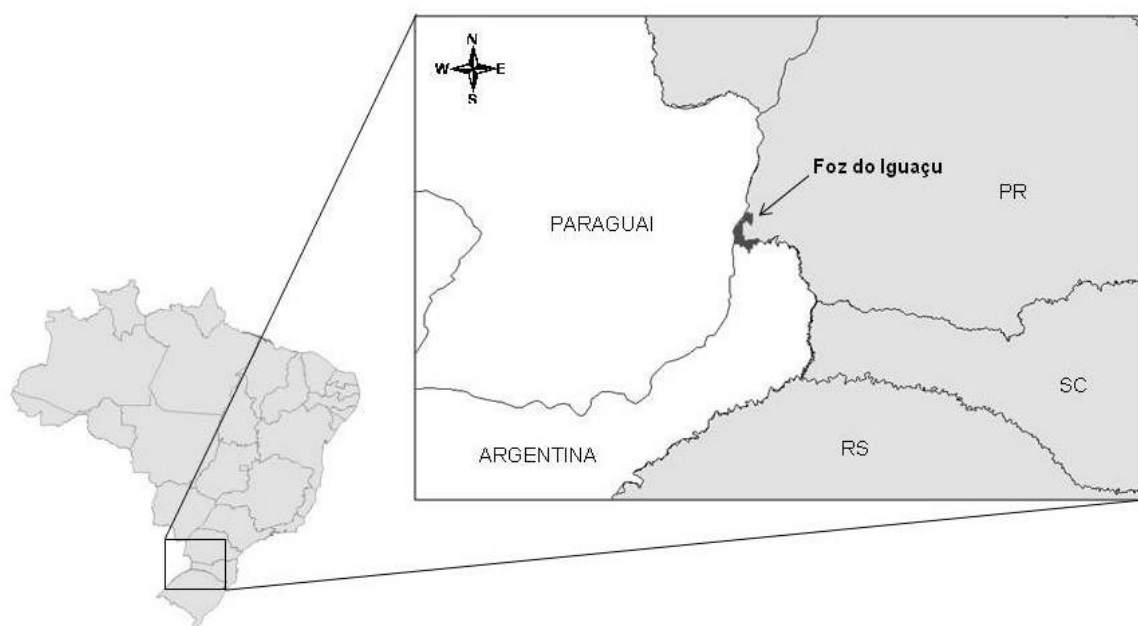


FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL
 FONTE: O autor (2010)

4.2.2 Animais experimentais

Foram utilizadas 31 capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), sendo 10 capivaras de cativeiro pertencentes ao zoológico do RBBV e 21 capivaras de vida livre que residem soltas na área da Itaipu Binacional. No período de agosto de 2006 a agosto de 2007, após autorização oficial do IBAMA (Protocolo 12587-1), os roedores foram contidos manualmente e posteriormente anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (0,5 mg/kg) e cloridrato de ketamina 10% (7 mg/kg), associados na mesma seringa. Amostras de sangue foram obtidas da veia femoral usando tubos a vácuo sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas para a obtenção dos soros, os quais foram acondicionados em tubos plásticos de 1,5 mL Eppendorf® identificados e armazenados a -70°C até o processamento. Durante a inspeção física dos animais, foi adotado um regime de tempo de três minutos para a avaliação da presença de carrapatos em cada capivara. Todos os carrapatos encontrados foram colhidos e armazenados em tubos plásticos contendo álcool a 70% para posterior identificação taxonômica, segundo Barros-Battesti *et al.* (2006).

4.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI utilizada para este estudo consistiu na reação da amostra sérica com células VERO infectadas por *R. rickettsii* (cepa Taiaçu), *R. parkeri* (cepa AT24), *R. bellii* (cepa Mogi), *R. rhipicephali* (cepa HJ5), *R. amblyommii* (cepa Ac37) e *R. felis* (cepa Pedreira), fixadas em lâminas de microscopia para fluorescência. A reação entre o antígeno-anticorpo foi visualizada após a adição de isotiocianato de fluoresceína-rotulada ovinos IgG anti-capivara (produzido pelo Centro de Controle de Zoonoses, São Paulo), utilizando um microscópio com luz ultravioleta (Olympus BX60, Japan), como descrito anteriormente (PACHECO *et al.*, 2007). Para cada lâmina, houve um soro positivo (controle positivo) e um soro negativo (controle negativo) para comparação. Foi considerado sororeagente todo animal que reagiu a uma diluição $\geq 1:64$. As amostras positivas foram verificadas para títulos de até 1.024. Toda amostra com título pelo menos quatro vezes superior para determinada espécie de *Rickettsia*, em relação às outras espécies, foi considerada homóloga à primeira espécie testada (PACHECO *et al.*, 2007).

4.3 RESULTADOS

Dos 31 soros de capivaras testados contra os antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. felis*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephali* à diluição de 1:64, 19 (61,3%) reagiram a pelo menos uma das espécies testadas (TABELA 3). Foi encontrada soropositividade em 14 (45,2%), 12 (38,7%), 5 (16,1%), 4 (12,9%), 3 (9,7%) e 3 (9,7%) animais para *R. rickettsii*, *R. bellii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. felis* e *R. rhipicephali*, respectivamente.

A soropositividade encontrada para *R. rickettsii* foi de 6/10 (60%) nas capivaras de cativeiro. Essa frequência foi maior que a encontrada em capivaras de vida livre, de 8/21 (38,1%). A soropositividade para *R. bellii* foi similar em ambos os grupos, com 4/10 (40%) e 8/21 (38,1%) nas capivaras de cativeiro e de vida livre, respectivamente.

TABELA 3 – TÍTULOS FINAIS DE ANTICORPOS POR REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA SEIS ESPÉCIES DE *Rickettsia* EM CAPIVARAS DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A AGOSTO DE 2008

Soro	Títulos por RIFI para seis antígenos						PAERH
	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	
2*	256	-	128	-	-	-	
3*	128	-	64	-	-	-	
4*	128	-	-	-	-	-	<i>R. rickettsii</i>
5*	-	-	64	-	-	-	
8*	128	-	-	-	-	-	<i>R. rickettsii</i>
9*	64	-	-	-	-	-	
10*	64	256	64	-	-	-	<i>R. parkeri</i>
11	-	-	128	-	-	-	<i>R. bellii</i>
1a	-	-	-	-	128	128	
2a	512	512	256	128	512	512	
3a	256	128	-	-	-	-	
1	-	-	64	-	-	-	
2	256	128	256	128	256	64	
3	64	-	64	-	-	-	
4	128	128	64	64	128	-	
5	64	-	64	-	-	-	
8	-	-	64	-	-	-	
12	64	-	-	-	-	-	
13	64	-	-	-	-	-	

FONTE: O autor (2010)

NOTA: PAERH: possível antígeno envolvido em reação homóloga (soro com título de anticorpos pelo menos quatro vezes superior para determinada espécie de *Rickettsia* em relação às outras espécies foi considerado homólogo para a primeira espécie de *Rickettsia* testada)

-: não-reativo para título ≥ 64

*Origem: cativo

De acordo com as diferenças nos títulos finais de anticorpos das amostras sororeativas, foi possível determinar o provável agente causador de infecção em quatro animais. Duas capivaras de cativeiro tiveram títulos sugestivos de infecção por *R. rickettsii* e uma amostra apresentou reação homóloga frente à *R. parkeri*. Uma capivara de vida livre apresentou evidência de infecção por *R. bellii*.

Um total de 260 carrapatos, sendo 140 adultos, 114 ninfas e 6 larvas, foi coletado das capivaras amostradas. Todos os adultos foram identificados como *Amblyomma dubitatum* (92 fêmeas e 48 machos) (TABELA 4).

TABELA 4 – CARRAPATOS COLETADOS EM CAPIVARAS DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A AGOSTO DE 2008

Capivara	Carrapatos				Total
	<i>Amblyomma dubitatum</i>		<i>Amblyomma</i> sp.		
	♀	♂	Larva	Ninfa	
1a*	1	-	6	37	44
2a*	-	1	-	22	23
3a*	-	-	-	21	21
4a	-	1	-	13	14
1*	6	-	-	1	7
2*	12	5	-	-	17
3*	17	4	-	1	22
4*	6	1	-	3	10
5*	10	2	-	1	13
6	2	3	-	6	11
7	2	6	-	1	9
8*	3	3	-	-	6
9	9	1	-	-	10
10	3	3	-	1	7
11	5	1	-	2	8
12*	-	8	-	1	9
13*	2	3	-	1	6
14	6	-	-	-	6
15	3	5	-	1	9
16	5	1	-	2	8
Total	92	48	6	108	260

FONTE: O autor (2010)

NOTA: * : Capivaras positivas para *Rickettsia* spp. na RIFI

- : Ausência

4.4 DISCUSSÃO

A prevalência de soros de capivaras reagentes, no presente estudo, com título ≥ 64 para *Rickettsia* spp. foi de 61,3%. Esse resultado é similar àquele encontrado para *Rickettsia* spp. (74%) em capivaras de localidades não endêmicas do Estado de São Paulo (PACHECO *et al.*, 2007). Em outro estudo sorológico conduzido em cinco áreas onde a FMB foi anteriormente relatada em seres humanos, também do Estado de São Paulo, a soroprevalência para *R. rickettsii* oscilou entre 7,3% e 59,4% nas capivaras amostradas (SOUZA *et al.*, 2008).

Nesse mesmo estudo, soros de capivaras de três locais sem registro de casos humanos também foram testados, sendo todos negativos frente à RIFI. Vale

ainda ressaltar que, em um dos locais estudados, capivaras sororeagentes somente foram detectadas posteriormente à notificação da doença no local (SOUZA *et al.*, 2008). No presente estudo, devido à alta prevalência encontrada nas capivaras, é possível que haja a circulação do agente da FMB e/ou demais riquetsias entre os grupos de animais estudados, sendo possível a participação da capivara no ciclo de *Rickettsia* spp. na região.

Pesquisas sorológicas em animais silvestres para riquetsioses no Brasil têm sido feitas predominantemente no Estado de São Paulo (HORTA *et al.*, 2007; PACHECO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008), encontrando soropositividade para riquetsias em capivaras e gambás. Pacheco *et al.* (2007) encontraram soropositividade de 26,0%, 34,2% e 68,5% para *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, respectivamente, em 73 capivaras provenientes de seis localidades no Estado de São Paulo, onde a FMB nunca foi relatada. Diferentemente, no presente estudo, o agente encontrado com maior frequência foi *R. rickettsii* (45,2%), seguido por *R. bellii* (38,7%) e *R. parkeri* (16,1%).

A evidência de infecção por *R. rickettsii* encontrada em duas capivaras não era esperada, por ser uma região considerada livre da doença. Esse fato é importante porque Foz do Iguaçu constitui fronteira com Paraguai e Argentina. Assim, o risco de infecção pela bactéria pode ser estendido para esses países próximos, fazendo dessa doença um problema internacional.

Além da *R. rickettsii*, houve a evidência de infecção por *R. parkeri* e *R. bellii* entre os animais estudados. Pacheco *et al.* (2007) relataram a primeira evidência de infecção natural por *R. bellii* em hospedeiros vertebrados e *R. parkeri* em capivaras no Estado de São Paulo. Nossos achados indicam a possibilidade de ocorrência de casos clínicos humanos causados por *R. rickettsii* e *R. parkeri* no local, os quais podem estar sendo subnotificados devido à ausência de relatos de riquetsioses em seres humanos e animais na região até o presente momento. Embora comprovado o potencial patogênico de *R. rickettsii* e *R. parkeri*, o papel da *R. bellii* causando infecção no homem é desconhecido e deve ser investigado, assim como a susceptibilidade da capivara para esse agente (PACHECO *et al.*, 2007). Devido aos baixos títulos encontrados nas capivaras sororeagentes, não foi possível indicar a existência de um agente específico circulando na área de estudo.

Todos os carrapatos adultos retirados manualmente sobre as capivaras foram identificados como *A. dubitatum*. Em pesquisa realizada a partir de capivaras

oriundas de seis municípios do Estado de São Paulo, onde não há registros de FMB até o momento, foram observadas evidências sorológicas de infecção por *R. parkeri* em apenas um município e, por *R. bellii* em outros quatro locais, onde a maior parte das capivaras estavam infestadas pela mesma espécie de vetor (PACHECO *et al.*, 2007). Mais recentemente, *R. bellii* foi a única espécie de riquetsia encontrada infectando carrapatos *A. dubitatum* no Estado de São Paulo (PACHECO *et al.*, 2009), indicando que a maior parte das populações dessa espécie de carrapato nesse Estado encontra-se infectada por *R. bellii*, enquanto a infecção por espécies como *R. rickettsii* e *R. parkeri* parece ser um achado bastante raro nesse carrapato (PACHECO *et al.*, 2009; LEMOS *et al.*, 1996). No presente estudo, o objetivo não foi realizar a pesquisa de infecção por *Rickettsia* nos carrapatos coletados.

Em um parque urbano de Londrina-PR, onde existe a presença de capivaras e sem relatos de FMB até o momento, carrapatos *A. cajennense* e *A. dubitatum* foram coletados sobre a vegetação durante o período de agosto de 2006 a julho de 2007, sendo encontrada uma maior densidade populacional nos meses mais quentes, indicando uma maior exposição de pessoas visitantes e funcionários do parque a carrapatos nesses meses (TOLEDO *et al.*, 2008). Nesse mesmo estudo, um total de 775 *A. dubitatum* e 392 *A. cajennense* foi testado por meio da PCR para o gene *gltA*, presente em todas as espécies de riquetsias, sendo todos os resultados negativos. Entretanto, foi encontrado 20,6% (7/34) de soropositividade contra *R. rickettsii* em soros de funcionários do parque, comprovando a presença de riquetsias do GFM circulando entre a população humana estudada (TOLEDO, 2008).

A presença elevada de capivaras em áreas endêmicas para FMB no Estado de São Paulo, onde o *A. cajennense* é incriminado como o principal vetor, tem resultado em uma alta carga parasitária ambiental. Dessa forma, o crescente aumento da espécie animal pode estar associado ao ressurgimento da doença em muitos locais do Estado de São Paulo (SOUZA *et al.*, 2009) e, também, à ocorrência em novas áreas do país.

Em resumo, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, a evidência sorológica de *Rickettsia* spp. em capivaras de vida livre e em capivaras mantidas em cativeiro em Foz do Iguaçu, um importante local de fronteira com Paraguai e Argentina. Considerando o fato de que ambas as populações de capivaras vivem em estreito contato e também com outros animais, inclusive seres humanos, acredita-se que haja a subnotificação de riquetsioses. Destaca-se, aqui, a importância de se

estabelecer um programa de vigilância ativa, bem como estudos futuros, como, por exemplo, a pesquisa de infecção por *Rickettsia* em carrapatos coletados do ambiente, a fim de elucidar a dinâmica da FMB no local.

REFERÊNCIAS

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical**. Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006.

ESTRADA, D. A.; SCHUMAKER, T. T. S.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES NETO, E. J.; LINHARES, A. X. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 68-71, 2006.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic área in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 793-801, 2007.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from the *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869-873, 2007.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004a.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 90-98, 2004b.

LEMOS, E. R. S.; MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted fever in the group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 273-275, 1996.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. A.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, v. 27, p. 364-371, 2007.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S. A.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, 2009.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the western hemisphere. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 315-326, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PINTER, A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of New York Academic Science**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111-1113, 2007.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S.; BORBA, R. C.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the

transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 116-121, 2009.

SOUZA, C. E.; SOUZA, S. S. L.; LIMA, V. L. C.; CALIC, S. B.; CAMARGO, M. C. G. O.; SAVANI, E. S. M. M.; D'AURIA, S. R. N.; LINHARES, A. X.; YOSHINARI, N. H. Serological identification of *Rickettsia* spp from the spotted fever group in capybaras in the region of Campinas – SP – Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1694-1699, 2008.

TOLEDO, R. S. **Aspectos epidemiológicos de rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüinos e de *Rickettsia* spp em carrapatos em Londrina, PR.** 79 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; HAYDU, V. B.; VIDOTTO, O. Dinâmica sazonal de carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) em um parque urbano da cidade de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 50-54, 2008.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico sorológico atual da FMB em seres humanos e animais utiliza, em geral, como antígeno, a espécie *Rickettsia rickettsii*. No entanto, deve-se destacar o caráter emergente de novas riquetsioses nas Américas. Até o ano de 2000, apenas três espécies de riquetsias eram conhecidas na América do Sul (*R. rickettsii*, *R. prowazekii*, *R. typhi*) e, a partir do início do século 21, pelo menos sete outras riquetsias foram registradas em muitos países (*R. felis*, *R. parkeri*, *R. massiliae*, *Candidatus* “*R. amblyommii*”, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *Candidatus* “*R. andeanae*”). Entre essas novas espécies relatadas, apenas *R. felis*, *R. parkeri* e *R. massiliae* são atualmente reconhecidas como patógenos humanos (LABRUNA, 2009). Assim, algumas análises epidemiológicas são fundamentais para determinar o agente etiológico em um exame diagnóstico para FMB, como a circulação de diferentes espécies de riquetsias, as diferentes apresentações clínicas da doença e as diferentes taxas de letalidade apresentadas em cada região do Brasil. Desse modo, um resultado positivo para FMB, a partir de exame sorológico, deve ser interpretado com cautela.

Os casos humanos de FMB registrados na Região Sul do país, em sua maioria, não foram confirmados com relação à espécie de riquetsia envolvida. Adicionalmente, fatores epidemiológicos e clínicos, os quais diferem em vários aspectos dos casos relatados na Região Sudeste, sugerem que pelo menos parte deles não tenha sido causada pela *R. rickettsii*. Assim, em inquéritos sorológicos em populações animais e humanas, provenientes de áreas onde a epidemiologia da FMB e de outras riquetsioses é escassa ou desconhecida, como é o caso de grande parte da Região Sul, recomenda-se o uso de outras espécies, além da *R. rickettsii*, como antígeno.

No presente estudo, a soroprevalência (4,4%) encontrada para *Rickettsia* spp. nos cães amostrados no município de São José dos Pinhais, Paraná, foi considerada baixa, sugerindo ser mínimo o risco humano de infecção. Por serem, em sua maioria, cães errantes, que mantêm contato próximo com outros animais e seres humanos, além de possuírem livre acesso aos bairros do município, podem ser utilizados como sentinelas para a ocorrência da bactéria no local. Foi relatada,

pela primeira vez, a evidência de infecção natural por *R. bellii* e *R. felis* em cães no Sul do Brasil, indicando a possível circulação dessas espécies no local.

A coleta de carrapatos no município de São José dos Pinhais - PR, para posterior pesquisa do agente por meio da PCR, não é indicada. Tal fato justifica-se devido à baixa soroprevalência para *Rickettsia* spp. encontrada nos cães amostrados, o que sugere que os cães estão expostos a uma baixa população de vetores competentes infectados por *Rickettsia* spp. do GFM no município. Felizmente, outros estudos sorológicos realizados em cavalos e capivaras (sentinelas para FMB em áreas onde há a presença de *A. cajennense*), provenientes de diferentes locais do estado de São Paulo, têm indicado que um número muito pequeno de populações de *A. cajennense* é infectado por riquetsias do grupo da febre maculosa (SANGIONI *et al.*, 2005; PACHECO *et al.*, 2007). Esse achado corrobora com o número relativamente baixo de casos da doença relatados na Região Sudeste do Brasil, em contraste com a elevada população que está exposta a infestações por *A. cajennense*, como em áreas rurais. Mesmo em áreas endêmicas para a FMB, as taxas de infecção por *R. rickettsii* em populações de carrapatos *A. cajennense* são geralmente muito baixas, em torno de 1% (GUEDES *et al.*, 2005), ou tão baixas que, em alguns estudos, não foi encontrado ao menos um exemplar de carrapato infectado por *R. rickettsii* (SANGIONI *et al.*, 2005). Similarmente, um estudo recente encontrou 0,9% (6/669) de carrapatos *A. aureolatum*, agente incriminado como vetor da *R. rickettsii* na região metropolitana de São Paulo (PINTER e LABRUNA, 2006).

Apesar de a infecção natural por *R. rickettsii* em cães ter sido relatada nos EUA desde a década de 1980, a doença clínica nessa espécie animal foi apenas recentemente relatada no Brasil (LABRUNA *et al.*, 2009). O capítulo referente à revisão bibliográfica da FMB em cães buscou, além de reforçar a importância do cão como sentinela para distribuição de *Rickettsia* spp., descrever os principais fatores clínicos, diagnósticos e curativos da doença no cão disponíveis na literatura. Acredita-se que casos clínicos de FMB, tanto em seres humanos quanto em cães, sejam subnotificados no país e, possivelmente, mascarados por outras infecções. Assim, a distribuição geográfica da doença no país é, provavelmente, subestimada.

Em visita técnica à Itaipu Binacional realizada em dezembro de 2008, foi coletado um total de 18 carrapatos adultos (15 fêmeas e 3 machos) da espécie *A. dubitatum* sobre duas capivaras atropeladas na área da Itaipu. Todas as amostras

foram submetidas à extração de DNA, de acordo com o protocolo de Chomkzynski (1993) com modificações de Sangioni (2003). Posteriormente, as amostras extraídas foram testadas pela técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (ANEXO 8), utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) denominados *RpCS.877p* senso “forward” (GGGGGCCTGCTCACGGCGG 5'→3') e *RpCS.1258n* anti-senso “reverse” (ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA 5'→3'), os quais amplificam um fragmento de 381 pares de base (pb) do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de *Rickettsia* (REGNERY *et al.*, 1991). Dos 18 *A. dubitatum*, três (16,7%) amostras foram positivas para o gene *gltA* (ANEXO 9). Embora em número não representativo de carrapatos amostrados, esse resultado confirmou a infecção por *Rickettsia* spp. nas amostras positivas. Aliado à soroprevalência elevada encontrada nas capivaras de cativeiro e de vida livre de Foz do Iguaçu – PR , demonstrada no quarto capítulo dessa dissertação, evidencia-se a necessidade de estudos epidemiológicos futuros mais aprofundados na região, como a pesquisa do agente em carrapatos coletados a partir do meio ambiente, a fim de determinar qual a espécie de carrapato predominante na região e a espécie de riquetsia circulante.

REFERÊNCIAS

CHOMKZYNSK, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic área in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

MADEIRA, A. Surto de febre maculosa no estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 364, 2004.

FREITAS, M. O. **Deteccão de Rickettsias do Grupo Febre Maculosa em cães e eqüinos em São José dos Pinhais, PR**. 79 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. A.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, v. 27, p. 364-371, 2007.

PADDOCK, C. D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D. B.; BERG, J. M.; JOSEPH, R. J.; ZAKI, S. R.; CHILDS, J. E. Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 2, p. 197-199, 2002.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of New York Academic Science**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial Diseases**. New York London: CRC Press, 2007.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two Rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1576-1589, 1991.

SANGIONI, L. A. **Pesquisa de Infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa, em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo**. 2003. (Tese: Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	86
ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DA PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS – PR.....	87
ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA.....	88
ANEXO 4 – PROTOCOLO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	91
ANEXO 5 – FOTO DE SORO DE CÃO POSITIVO PARA A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) UTILIZANDO COMO ANTÍGENO A ESPÉCIE <i>Rickettsia rickettsii</i> , NA DILUIÇÃO DE 1:64. AUMENTO DE 400X.....	96
ANEXO 6 – CARACTERÍSTICAS DOS CÃES SOROPOSITIVOS NA RIFI E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	97
ANEXO 7 – IMAGEM AÉREA DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA, SITUADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU – PR, 2009.....	98
ANEXO 8 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	99
ANEXO 9 – FOTO DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE À 2% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO À 1,5%.....	100
ANEXO 10 – RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS DURANTE O CURSO DE MESTRADO.....	101
ANEXO 11 – ARTIGOS ENCAMINHADOS A REVISTAS CIENTÍFICAS DURANTE O CURSO DE MESTRADO.....	102

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 037/2008, referente ao projeto “Vigilância ativa da febre maculosa brasileira em cães de São José dos Pinhais-Pr”, sob a responsabilidade de Fernanda Silva Fortes, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 15 de dezembro de 2008. Este certificado expira em junho de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 037/2008, regarding the project “Vigilância ativa da febre maculosa brasileira em cães de São José dos Pinhais-Pr”, in charge of Fernanda Silva Fortes, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on December 15, 2008. This certificate expires on June, 2010.

Curitiba, 05 de junho de 2009.



Rogério Ribas Lange
Presidente



Fabiano Montiani Ferreira
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DA PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO JOSÉ DOS
PINHAIS – PR.



PREFEITURA MUNICIPAL
DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE

Ofício nº. 370/SMS

São José dos Pinhais, 30 de março de 2009.

Prezado Senhor:

Através deste, comunicamos o nosso parecer favorável à realização do projeto "Vigilância Ativa da Febre Maculosa Brasileira em Cães de São José dos Pinhais – PR" encaminhada através do Ofício 07/09 LDP.

Atenciosamente,

Elaine de Castro Neves
Diretora do Depto. de Saúde Comunitária

Alan César Diório
Secretário Municipal de Saúde

At. Senhor
Marcelo Molento
Médico Veterinário – Professor Adjunto da UFPR
Laboratório de Doenças Parasitárias
Rua dos Funcionários, 1540.
CEP: 80035-050 / Curitiba – PR

ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12587-1	Data da Emissão: 19/02/2008 16:48	Data de Validade: 18/02/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2083055	Nome: Wanderlei de Moraes	CPF: 010.992.048-10
Título do Projeto: Levantamento Sanitário em capivaras (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>) em vida livre, nas Áreas Protegidas da Itaipu Binacional		
Nome da Instituição : Itaipu Binacional		CNPJ: 00.395.988/0012-98

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade;
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico;
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação;
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ;
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente;
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade;
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Sandra Mara Rotter Curotto	Pesquisadora	039.502.749-79	75808844 ssp-PR	Brasileira
2	Leonilda Correia dos Santos	pesquisadora	338.176.509-49	1.082.900 I.I.PR-PR	Brasileira
3	Alexander Welker Biondo	pesquisador	104.159.508-58	172734617 II-SP	Brasileira
4	ZALMIR SILVINO CUBAS	pesquisador	519.550.249-87	3.187.774-1 IIPR-PR	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	FOZ DO IGUAÇU	PR	Áreas Protegidas da Itaipu Binacional	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (*Qtde: 50)
5	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
6	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Pêlo, Urina, Ectoparasita, Sangue, Fezes
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta (curral), Captura manual, Puçã, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Descoloração de pêlos, Tatuagem (tinta), Marcação australiana (picote na orelha)

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17427596

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12587-1	Data da Emissão: 19/02/2008 16:48	Data de Validade: 18/02/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2083055	Nome: Wanderlei de Moraes	CPF: 010.992.048-10
Título do Projeto: Levantamento Sanitário em capivaras (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>) em vida livre, nas Áreas Protegidas da Itaipu Binacional		
Nome da Instituição : Itaipu Binacional		CNPJ: 00.395.988/0012-98

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Itaipu Binacional	Hospital Veterinário da Itaipu Binacional
2	Itaipu Binacional	Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional
3	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	Entidade de Ensino Superior

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17427596

Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12587-1	Data da Emissão: 19/02/2008 16:48	Data de Validade: 18/02/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2083055	Nome: Wanderlei de Moraes	CPF: 010.992.048-10
Título do Projeto: Levantamento Sanitário em capivaras (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>) em vida livre, nas Áreas Protegidas da Itaipu Binacional		
Nome da Instituição : Itaipu Binacional		CNPJ: 00.395.988/0012-98

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17427596



Página 3/3

ANEXO 4 – PROTOCOLO DA REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Princípio do teste

O ensaio consiste na reação de amostras de soro ou plasma com células Vero infectadas por *Rickettsia* spp., fixadas em lâminas de microscopia para fluorescência. Aproximadamente 90-100% das células possuem formas cocobacilares da riquetsia, capazes de serem visualizadas numa reação positiva. Cocobacilos extracelulares também são comumente visualizados. A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras é visualizada após a adição de anti-imunoglobulina canina (Ig) conjugada com isotiocianato de fluoresceína. Para a leitura da reação, deve-se utilizar microscópio para fluorescência.

Material utilizado

1. Lâminas para RIFI contendo células Vero infectadas por *Rickettsia* spp.;
2. Soro controle positivo de cão;
3. Soro controle negativo de cão;
4. Anti-Ig canina conjugada com isotiocianato de fluoresceína;
5. Glicerina tamponada pH 9,0 \pm 0,5;
6. Azul de Evans 0,1%;
7. Tampão fosfato/salina (PBS) pH 7,2;
8. Tampão de lavagem (PBS com Triton X 100 a 0,1%);
9. Microplacas do tipo Elisa (96 pocinhos);
10. Micropipetas calibradas (P20, P200 e P1000);
11. Ponteiras sem filtro, de 20, 200 e 1000 μ L;
12. Recipiente com tampa para câmara úmida;
13. Cubas para lavagem de lâminas (tipo Koplin);
14. Luvas de látex descartáveis;
15. Recipiente para descarte de material contaminado;
16. Lamínulas 24 x 50 mm;
17. Papel alumínio e vidrarias em geral;
18. Estufa a 37°C;
19. Microscópio para fluorescência.

Conservação e estocagem do material

1. Lâminas para RIFI contendo células Vero infectadas por *Rickettsia* spp. (manter em freezer a -80°C);
2. Soros-controle positivo e negativo (manter em freezer a -20°C);
3. Anti-Ig canina conjugada com fluoresceína (manter em geladeira, entre 2 e 8°C);
4. Glicerina tamponada pH $9,0 \pm 0,5$ (manter em geladeira, entre 2 e 8°C);
5. Azul de Evans 0,2% (manter em geladeira, entre 2 e 8°C);

Cuidados e precauções

1. Somente para uso diagnóstico “in vitro”;
2. Ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, deve-se observar as precauções de biossegurança necessárias;
3. A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas de trabalho e segurança do laboratório:
 - As amostras, assim como as lâminas e outros insumos devem ser estocados e manipulados adequadamente;
 - Homogeneizar as amostras e os controles antes de usar;
 - Usar luvas descartáveis durante todas as etapas do teste;
 - Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, lâminas usadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio diluído a 1:20 ou água sanitária a 1:10;
 - Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
 - Todos os frascos utilizados para diluir os componentes devem estar muito bem limpos, secos e desengordurados.

Preparação do tampão fosfato pH 7,4 (PBS)

Sais	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl) PA 0,15 M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na_2HPO_4) PA – 0,0072 M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH_2PO_4) PA – 0,0028 M	0,34 g
Água destilada qsp (Quantidade suficiente para)	1.000 mL

Titulação do conjugado

Testes executados previamente com o mesmo lote de conjugado que está incluído neste kit demonstraram que a titulação ótima é de 1:400.

Procedimentos para a execução da RIFI

Teste qualitativo (para determinar se a amostra é reativa ou não reativa, na diluição de 1:64).

1. Para o protocolo de trabalho, podem ser avaliadas até 10 amostras de soro ou plasma por lâmina;
2. Retire da refrigeração as lâminas necessárias para testar as amostras, deixando-as imersas em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente e secando-as à temperatura ambiente, em seguida. Os controles positivo e negativo, e os demais reagentes deverão estar à temperatura ambiente para sua utilização;
3. Dilua as amostras a serem testadas e os soros-controle positivo e negativo a 1:64 em PBS. Para realizar esta diluição utilize 2,5 µL de soro ou plasma e adicione 157,5 µL de PBS. Homogeneize suavemente, evitando a formação de bolhas;
4. Adicione 20µL das diluições das amostras e dos soros-controle positivo e negativo em cada poço das lâminas;
5. Incube as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C;
6. Lave as lâminas com tampão de lavagem (usar piseta ou pipeta de Pasteur como auxiliar);
7. Deixá-las em cuba com tampão de lavagem durante 15 minutos;
8. Transferir as lâminas para outra cuba, também com tampão de lavagem e aguardar mais 15 minutos;
9. Deixe as lâminas secarem à temperatura ambiente;
10. Dilua o conjugado anti-Ig canina-fluoresceína, na proporção adequada obtida com a prévia titulação do conjugado, em PBS;
11. Adicione 20 µL da diluição do conjugado em todos os poços das lâminas;
12. Incube as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37°C, ao abrigo de qualquer fonte de luz;
13. Lave as lâminas com tampão de lavagem (usar piseta ou pipeta de Pasteur como auxiliar);

14. Prepare uma solução com azul de Evans na proporção de 0,3 mL para cada 100 mL de tampão de lavagem; em cuba apropriada, deixe as lâminas durante 15 minutos, cobertas com papel alumínio para proteger de qualquer fonte de luz;
15. Repita o passo anterior por mais 15 minutos;
16. Deixe as lâminas secarem a temperatura ambiente, sempre ao abrigo da luz;
17. Adicione de 4 a 5 gotas de glicerina tamponada sobre cada lâmina, cobrindo-a com lamínula, evitando a formação de bolhas. Mantenha-as sob abrigo da luz e a seco, até o momento da leitura.

Leitura

Para a leitura e interpretação das reações, utilize o microscópio de imunofluorescência e objetiva de 40X.

1. Focalize a lâmina na posição do soro controle positivo e observe a fluorescência presente em cerca de 90-100% das células;
2. Focalize a lâmina na posição do soro controle negativo e observe a ausência de fluorescência nas células, bem como a coloração de fundo (“background”);
3. Proceda à leitura das amostras, considerando os padrões:

NÃO REAGENTE – ausência de fluorescência intracelular compatível com o formato padrão de riquetsias (formas cocobacilares);

REAGENTE – presença de fluorescência intracelular compatível com o formato padrão de riquetsias (formas cocobacilares) no interior da grande maioria das células, e no espaço extracelular também.

Teste quantitativo (realizado apenas para as amostras reativas no teste qualitativo)

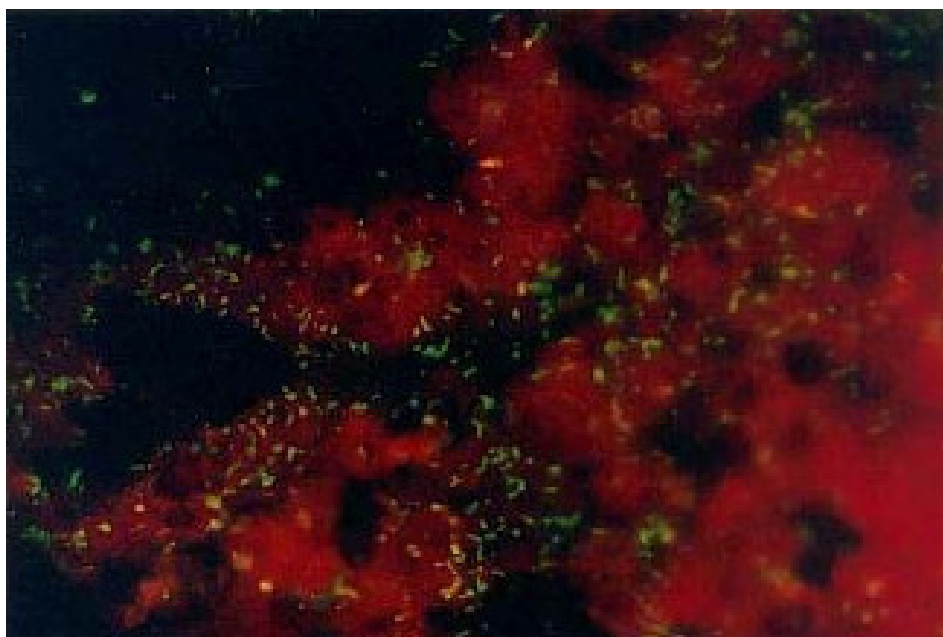
1. Para essa parte do trabalho, considere uma lâmina para cada 2 amostras de soro ou plasma que se mostraram reativas a diluição de 1:64 no teste qualitativo;
2. Faça a diluição como no teste qualitativo; as diluições subsequentes (1:128, 1:256, 1:512, 1:1024) devem ser feitas em microplacas adicionando-se quantidades iguais de PBS e diluição anterior.
3. Considere a amostra como reativa até a última diluição em que estruturas morfológicamente compatíveis com riquetsias (formas coco-bacilares) estejam sendo visualizadas no interior da grande maioria das células. Esta última diluição corresponderá ao título de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. da amostra. Caso uma

amostra de soro ou plasma se mostre reativa até a diluição de 1:1024, deve-se continuar os testes de diluição desta amostra numa nova lâmina;

Considerações

A RIFI é considerada a prova padrão-ouro para o diagnóstico de riquetsioses em seres humanos e animais, sendo um importante instrumento para o diagnóstico e a vigilância da febre maculosa. A confirmação da prova se dá por meio da visualização da reatividade nas formas cocobacilares da bactéria. Desta forma, para uma leitura adequada, deve-se sempre ter em mente o padrão morfológico de uma riquétisia (tamanho e forma), que deve ser buscado principalmente no interior de células. No entanto, lâminas feitas com 100% de células infectadas também apresentam muitas riquetsias no espaço extracelular, em função da ruptura de células durante o processo de confecção das lâminas. Para um diagnóstico definitivo da febre maculosa, por meio da RIFI, devem ser testadas amostras pareadas (duas amostras de soro ou plasma colhidas do mesmo paciente, intervaladas de 2 a 3 semanas, sendo a primeira na fase aguda da doença, e a segunda na fase de convalescença). Por esta razão, devem ser determinados os títulos de anticorpos reativos para cada amostra, pois o diagnóstico é considerado positivo somente quando o título da segunda amostra for, no mínimo, quatro vezes superior ao título da primeira amostra.

ANEXO 5 – FOTO DE SORO DE CÃO POSITIVO PARA A REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) UTILIZANDO COMO ANTÍGENO A ESPÉCIE *Rickettsia rickettsii*, NA DILUIÇÃO DE 1:64. AUMENTO DE 400X



FONTE: SANGIONI, 2003¹.

¹ SANGIONI, L. A. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo.** 86f. Tese (Doutorado) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ANEXO 6 – CARACTERÍSTICAS DOS CÃES SOROPOSITIVOS NA RIFI E ANÁLISE ESTATÍSTICA

TABELA 1 – DEMONSTRATIVO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS (IDADE, SEXO, RAÇA E SITUAÇÃO DOMICILIAR) E A POSITIVIDADE NA RIFI À DILUIÇÃO DE 1:64 PARA *Rickettsia* spp. EM CÃES NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007

Amostras Positivas	Idade	Sexo	Raça	Situação Domiciliar
8	Idoso	Macho	S.R.D.	Não-domiciliado
27	Adulto	Fêmea	S.R.D.	Domiciliado
86	Adulto	Macho	C.R.D.	Domiciliado
103	Adulto	Macho	S.R.D.	Não-domiciliado
107	Adulto	Fêmea	S.R.D.	Não-domiciliado
138	Adulto	Macho	C.R.D.	Domiciliado
145	Adulto	Fêmea	S.R.D.	Domiciliado
162	Adulto	Macho	S.R.D.	Não-domiciliado
163	Adulto	Macho	C.R.D.	Domiciliado
183	Adulto	Macho	S.R.D.	Domiciliado
204	Adulto	Fêmea	S.R.D.	Não-domiciliado
244	Adulto	Fêmea	S.R.D.	Não-domiciliado
295	Adulto	Macho	C.R.D.	Não-domiciliado
344	Adulto	Macho	S.R.D.	Não-domiciliado
346	Adulto	Macho	C.R.D.	Não-domiciliado
354	Adulto	Fêmea	S.R.D.	Não-domiciliado

FONTE: O autor (2010)

NOTA: S.R.D.: sem raça definida

C.R.D.: com raça definida

TABELA 2 – ASSOCIAÇÃO ESTATÍSTICA DA POSITIVIDADE NA RIFI À DILUIÇÃO DE 1:64 PARA *Rickettsia* spp. COM IDADE, SEXO, RAÇA E SITUAÇÃO DOMICILIAR, UTILIZANDO O TESTE DO QUI-QUADRADO, EM CÃES NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007

Variáveis	Opções	Positivos/Total (%)	Valor de p
Idade	Adulto	15/327 (4,6)	0,6579
	Idoso	1/14 (7,1)	
Raça	S.R.D	11/230 (4,8)	0,6370
	C.R.D.	5/134 (3,7)	
Sexo	Macho	10/218 (4,6)	0,8276
	Fêmea	6/146 (4,1)	
Origem	Domiciliado	6/142 (4,2)	0,8992
	Não domiciliado	10/222 (4,5)	

FONTE: O autor (2010)

ANEXO 7 – IMAGEM AÉREA DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA, SITUADO
NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU – PR, 2009

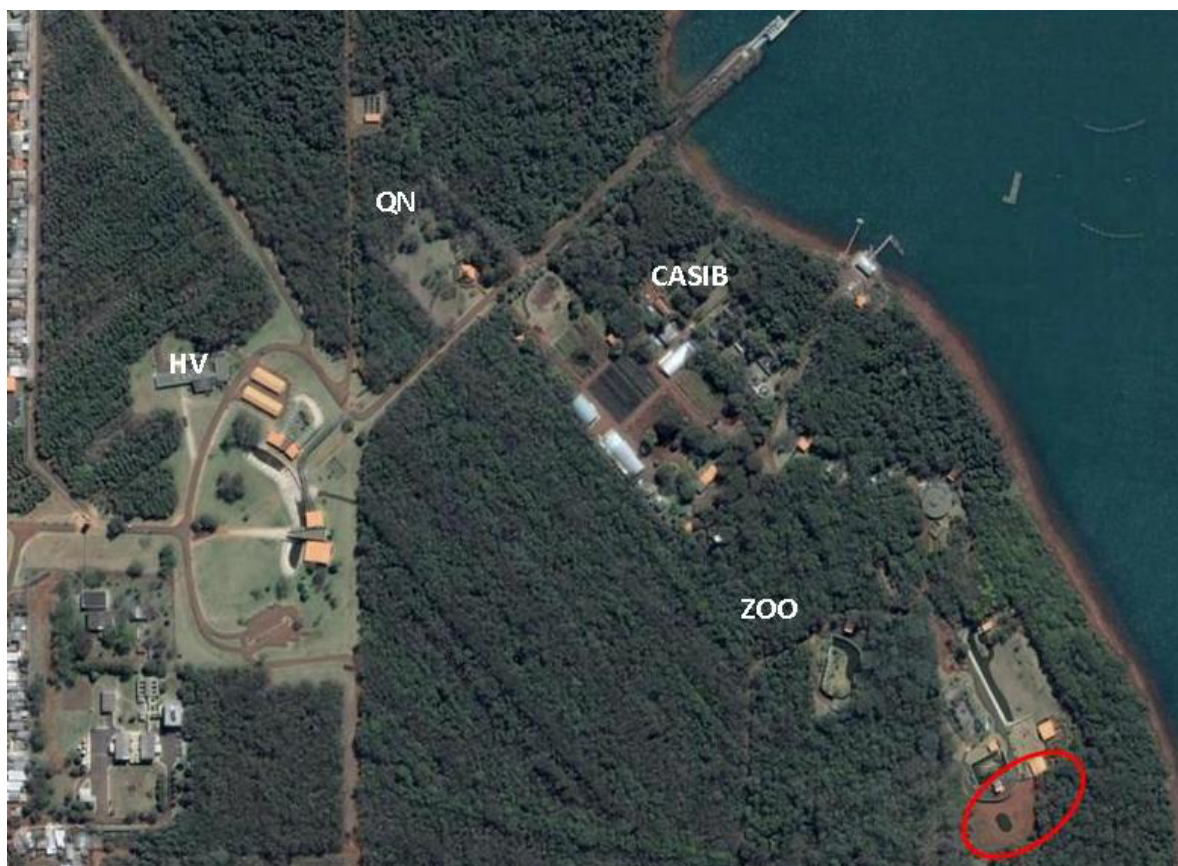


FOTO AÉREA DA ÁREA CONSTRUÍDA DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA

FONTE: CUROTTO, 2009¹

NOTA: HV: Hospital Veterinário; QN: quarentenário; CASIB: Criadouro de Animais Selvagens da Itaipu Binacional; ZOO: Zoológico Roberto Ribas Lange. Área em destaque: Recinto das capivaras, catetos e antas.

¹ CUROTTO, S. M. R. **Deteção microscópica e molecular de *Plasmodium* sp. em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Refúgio Biológico Bela Vista, Foz do Iguaçu, Paraná.** 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

ANEXO 8 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Reagentes	Citrato Sintase (<i>gltA</i>)
Tampão “buffer” 10x	2,5 µL
Nucleotídeos trifosfatados (Dntp 1,25 mM)	4,0 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µL
Primer Foward (pmoles/µL)	1,25 µL
Primer Reverse (pmoles/µL)	1,25 µL
Taq polimerase (5000 U/mL)	0,15 µL
H ₂ O mili Q q.s.p.	12,6 µL
TOTAL	22,5 µL

QUADRO 1 – CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES EMPREGADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE ACORDO COM O GENE ALVO BUSCADO PARA DETECÇÃO DE *Rickettsia* spp.

FONTE: O autor (2010)

Etapas	Citrato Sintase (<i>gltA</i>)
Desnaturação inicial	95°C; 3 min
Número de ciclos	40
Desnaturação	95°C; 15 seg
Anelamento	48°C; 30 seg
Extensão	72°C; 30 seg
Extensão final	72°C; 7 min

QUADRO 2 – PROTOCOLO DO TERMOCICLADOR DE ACORDO COM O GENE ALVO UTILIZADO NA PCR PARA DETECÇÃO DE *Rickettsia* spp.

FONTE: O autor (2010)

ANEXO 9 – FOTO DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE À 2% CORADO
COM BROMETO DE ETÍDIO À 1,5%

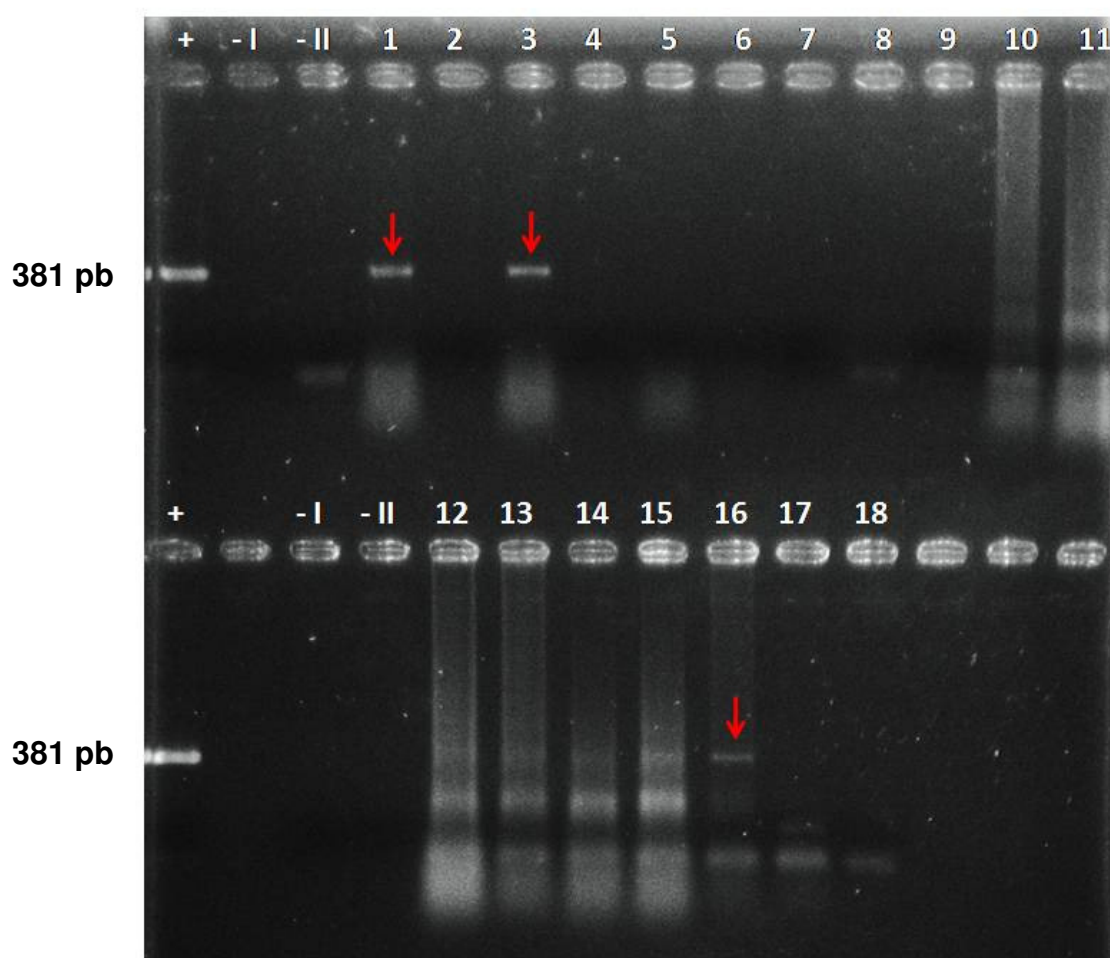


FIGURA 1 – PCR PARA DETECÇÃO DO GENE CITRATO SINTASE *gltA* DE *Rickettsia* spp. EM 18 CARRAPATOS COLETADOS DE DUAS CAPIVARAS (*Hydrochaeris hydrochaeris*) UTILIZANDO OS PRIMERS *RpCS.877p* SENSO (GGGGGCCTGCTCACGGCGG 5'→3') e *RpCS.1258n* ANTI-SENSO (ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA 5'→3')

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Coluna +: controle positivo (DNA de *Rickettsia rickettsii*). Colunas - I e - II: controle negativo (água). Colunas 2, 4 a 15, 17 e 18: amostras de carrapatos negativos. Colunas 1, 3 e 16: amostras de carrapatos positivos. Setas: bandas específicas (381 pb).

ANEXO 10 – RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS DURANTE
O CURSO DE MESTRADO

1. CUROTTO, S. M. R.; FORTES, F. S.; SANTOS, L. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; GRYCAJUK, M. C. H.; BARROS-FILHO, I. R.; PACHECO, R. C.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia* spp. serological diagnosis in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from Foz do Iguaçu, Brazil. In: XI CONGRESSO E XVII ENCONTRO ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS – ABRAVÁS, 2008, Santos. **Anais...** Santos: 2008. p. 76-79.
2. DUTRA, L. H.; MOLENTO, M. B.; NAUMANN, C. R. C.; SAVIO, D.; FORTES, F. S.; MALONE, J. B. Epidemiologia da fasciolose bovina no Brasil com auxílio do sistema de informação geográfica na Região Sul. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA E II ENCONTRO DE PARASITOLOGIA DO MERCOSUL, 2009, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: 2009. 1 CD-ROM.
3. DUTRA, L. H.; SAVIO, D.; FORTES, F. S.; MALONE, J. B.; NAUMANN, C. R. C.; MOLENTO, M. B. Geographic information system surveillance of Fasciolosis in cattle during 2003 to 2008 in Southern Brazil. In: WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 2009, Calgary, Canadá. **Anais...** Calgary: 2009. p. 76-79.
4. FORTES, F. S.; SANTOS, L. C.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE FILHO, R. V.; CUROTTO, S. M. R.; BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Diagnóstico sorológico de *Rickettsia* spp. em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de Foz do Iguaçu, Paraná. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA E II ENCONTRO DE PARASITOLOGIA DO MERCOSUL, 2009, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: 2009. 1 CD-ROM.
5. FORTES, F. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE FILHO, R. V.; DUTRA, L. H.; BIONDO, A. W.; BONACIM, J.; JACON, A. P.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Soroprevalência de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa em cães de São José dos Pinhais – PR. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA E II ENCONTRO DE PARASITOLOGIA DO MERCOSUL, 2009, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: 2009. 1 CD-ROM.

ANEXO 11 – ARTIGOS ENCAMINHADOS A REVISTAS CIENTÍFICAS DURANTE O
CURSO DE MESTRADO

1. DUTRA, L. H.; MOLENTO, M. B.; NAUMANN, C. R. C.; BIONDO, A. W.; FORTES, F. S.; SAVIO, D.; MALONE, J. B. Mapping risk of bovine fasciolosis in the South of Brazil using Geographic information systems. **Veterinary Parasitology** (Print), 2009.
2. FORTES, F. S.; DUTRA, L. H.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B. Febre maculosa brasileira em cães: revisão. **Semina: Ciências Agrárias**, ID 2780, Envio 07/08/2009, Situação: em fila para avaliação.
3. FORTES, F. S.; DUTRA, L. H.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE, R. V.; JACON, A. P.; BIONDO, A. W.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in dogs from the Sao Jose dos Pinhais city, Parana, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** (a ser submetido)
4. FORTES, F. S.; SANTOS, L. C.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W.; DUTRA, L. H.; BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; CUROTTO, S. M. R.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Frequency of antibodies against *Rickettsia* spp. in free ranging and captive capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from the Foz do Iguaçu city, Paraná, Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** (a ser submetido)

VITA

Fernanda Silva Fortes é Médica Veterinária, formada pela Universidade Federal do Paraná, atuando principalmente nas seguintes áreas: medicina veterinária preventiva, epidemiologia, zoonoses, parasitologia veterinária, doenças parasitárias e biologia molecular.

Durante a graduação, foi bolsista do projeto de extensão universitária “Controle de Zoonoses em Curitiba e Região Metropolitana”, monitora na disciplina de Zoonoses, e realizou iniciação científica com o projeto de pesquisa “Vigilância Molecular da Leptospirose em Roedores no Estado do Paraná”. Cumpriu o estágio final de graduação no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da Universidade Estadual Paulista, UNESP.

Em seu currículo, consta um artigo completo publicado em periódico, um artigo aceito para publicação, uma co-autoria de capítulo de livro, dois resumos expandidos publicados em anais de congressos, seis resumos publicados em anais de congressos, sete apresentações de trabalhos, uma participação em banca de comissão julgadora, 16 participações em eventos científicos e uma participação em organização de evento científico. Obteve aprovação em terceiro lugar no Teste Seletivo para Professor Colaborador na área de Parasitologia, Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva (Edital 049/2009-DIRCOAV/UNICENTRO 31/07/2009), pertencente à Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro), Guarapuava, Paraná. Obteve aprovação em sexto lugar no Processo Seletivo Doutorado 2009/2010 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná e em nono lugar no Processo Seletivo Doutorado 2009/2010 do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

É integrante dos Projetos de Pesquisa “Identificação de marcadores moleculares para a resistência aos medicamentos e desenvolvimento de vacina recombinante utilizando o genoma do *Haemonchus contortus*” (Processo 559614/2009-8 CNPq) e “Técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico da resistência antiparasitária em helmintos de importância veterinária” (Edital MCT/CNPq/CTBio/CBAB nº 40/2009 - Cursos para Formação de RH em Biotecnologia - CBAB).